



TITLE:

# 細胞周期分裂期の進行を制御する 新しいプロテインキナーゼdsk 1の 研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

竹内, 雅博

---

CITATION:

竹内, 雅博. 細胞周期分裂期の進行を制御する新しいプロテインキナーゼdsk 1の研究. 京都大学, 1993, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1993-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3066147>

RIGHT:

# 細胞周期分裂期の進行を制御する 新しいプロテインキナーゼdsk1の研究

## 目次

要旨	1
序論	2
結果:	4-27
dsk1 <sup>+</sup> 遺伝子はプロテインキナーゼホモログをコードする	4
dsk1 <sup>+</sup> 遺伝子破壊株は生育できる	9
dsk1 <sup>+</sup> 遺伝子は二種の移動度の近い、分子量 ~60 Kdのタンパク質を産する	9
dsk1は磷酸化タンパク質であり、種々の細胞周期変異株でその磷酸化状態が変動する	12
細胞周期特異的なdsk1のバンドシフト	12
In vitroでのdsk1のタンパク質セリン/スレオニン/チロシン自己磷酸化	14
dsk1によるin vitroでのミエリン塩基性タンパク質(MBP)の磷酸化	16
dsk1の過剰発現によりG2期から分裂期への移行が遅延される	18
分裂期停止した細胞におけるdsk1キナーゼ活性の上昇	21
野生株、G2期停止、分裂期停止した細胞でのdsk1タンパク質の免疫蛍光による細胞内局在	22
cs dis1変異とIIA型プロテインホスファターゼ(ppa2)、dsk1プロテインキナーゼの関係	24
cs dis1変異はppa2遺伝子欠失( $\Delta ppa2$ )によって相補される	
IIA型プロテインホスファターゼ(ppa2)とdsk1プロテインキナーゼはcs dis1変異に拮抗的に働く	26
考察:	28-40
分裂酵母dsk1プロテインキナーゼは二重特異性	
プロテインキナーゼ(dual specific protein kinase)である	28
dsk1タンパク質の制御された磷酸化	31
dsk1 <sup>+</sup> 遺伝子は生育に必須ではない	34
dsk1 <sup>+</sup> 過剰発現の影響と細胞内局在の関係	36
dsk1キナーゼ活性の変動	39
IIA型プロテインホスファターゼとdsk1キナーゼの反応はcs dis1変異に関して拮抗する	39
材料と方法	41-45
参考文献	46-54



## 要旨

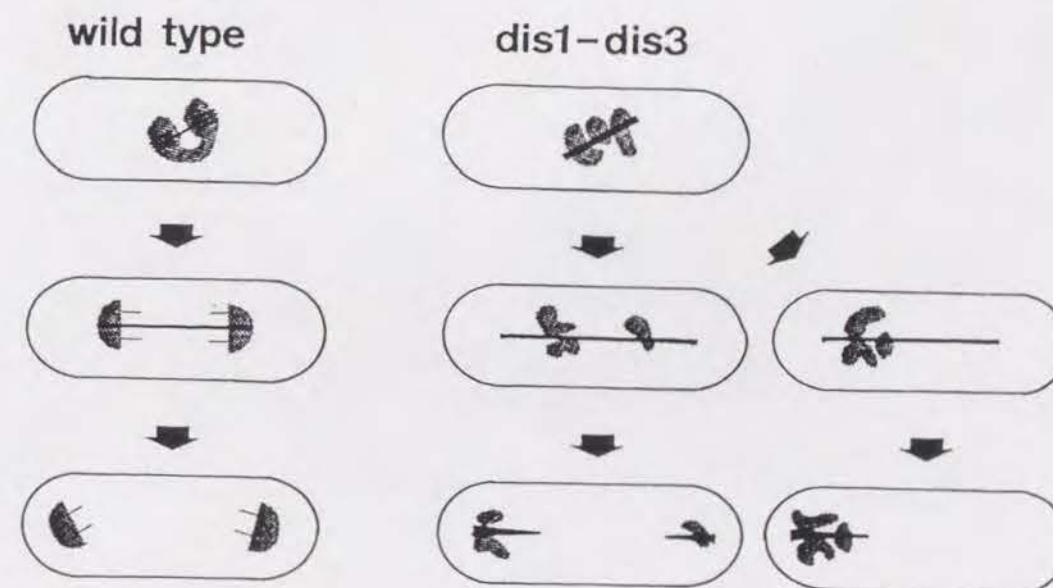
染色体の正確な分配は細胞周期の分裂期(M期)でおこる。分裂酵母低温感受性 *dis1*, *dis2*, *dis3* 変異株では低温下で姉妹染色分体が分離せず、異常な分裂期像を呈する。*dis*<sup>+</sup> 遺伝子産物の機能及び *dis* の現象を理解するための研究の一環として、多コピー遺伝子発現によって *dis1* 変異を相補するサプレッサー遺伝子の一つ *dsk1*<sup>+</sup> を分離し、機能解析を行い、染色体分配の制御機構における役割を明かにしようとしてきた。

*dsk1*<sup>+</sup> 遺伝子は生育に必須ではないが、過剰発現させるとG2期から分裂期への進入を阻害する作用と分裂期からG1期への脱出を促進させる両面性を示す。クローン化した *dsk1*<sup>+</sup> 遺伝子の塩基配列決定より、分子量61 Kdのスペーサー部分を有する新しいプロテインキナーゼをコードすることが判明した。*dsk1* タンパク質を細胞内で同定検出するために抗体を作成した。細胞内 *dsk1* タンパク質は、それ自身リン酸化されており、リン酸化に依存してSDS-PAGE上で移動度が異なり、二本のタンパク質バンドを示す。リン酸化レベルは細胞周期のステージに応じて著しい変動を示す；分裂期停止した細胞中では過剰リン酸化型(SDS-PAGE上で移動度が小さい)が顕著であり、G2期停止した細胞中ではリン酸化レベルの低い型(SDS-PAGE上で移動度が大きい)が蓄積する。*dsk1* キナーゼは、*in vitro* で自己リン酸化されて、三種のリン酸化アミノ酸(セリン、スレオニン、チロシン)が検出された。基質特異性は狭く、唯一見い出された基質であるミエリン塩基性タンパク質(MBP)では、リン酸化チロシンは検出されない。分裂期停止した細胞の *dsk1* 免疫複合体(高度にリン酸化された *dsk1* を含む)は、G2期停止した細胞及び野生株の *dsk1* に比して数倍高いキナーゼ活性を持つ。これから、分裂期からの脱出に高いキナーゼ活性が必要なことが予想される。抗 *dsk1* 抗体を用いて細胞周期における *dsk1* タンパク質の細胞内局在を調べた。その結果、G2期細胞では細胞質に、一方分裂期細胞では核内に蓄積することを見い出した。更に、キナーゼ触媒ドメインVIとVIIの間にあるスペーサー領域を欠いた *dsk1* タンパク質は細胞周期を通じて核内に存在することが判明した。

以上の結果から、*dsk1* タンパク質は細胞周期特異的に細胞質と核間を移行するプロテインキナーゼである。細胞内局在は *dsk1* タンパク質自身のリン酸化状態の変化によって制御されている可能性があり、分裂期においては核内高度リン酸化 *dsk1* 産物は高キナーゼ活性を示した。これから、細胞内局在の変化とキナーゼ活性の変動によって *dsk1* キナーゼが分裂期の進入と脱出を制御しているという仮説を論じた。また、遺伝学的解析から *dsk1* はIIA型プロテインホスファターゼと緊密に関連しつつ、染色体分配を制御することが示唆された。これは、低温感受性 *cs dis1* 変異はIIA型プロテインホスファターゼ *ppa2*<sup>+</sup> 遺伝子欠失( $\Delta ppa2$ )によって相補されるという事実に基づく。すなわち、 $\Delta ppa2$  の *dis1* 変異相補能は、*dsk1*<sup>+</sup> 遺伝子の存在に依存する。

## 序論

分裂酵母における細胞周期の研究は真核生物全般に保存された制御機構を明かにしてきた(Nurse 1990)。真核生物では二つの主要なコントロールポイント、G1期からS期、G2期から分裂期への移行はcdc2プロテインキナーゼの活性をコントロールすることで制御されている。分裂期への移行はcdc2プロテインキナーゼのcdc13サイクリンB(Booher and Beach, 1988; Hagan et al., 1988)との会合及びcdc2プロテインキナーゼのATP結合部位内の15番目のチロシン残基の脱リン酸化が必須である。*wee1/mik1* プロテインキナーゼはこの部位のリン酸化を担いcdc2プロテインキナーゼの活性を負に制御する(Gould and Nurse, 1989; Featherstone and Russell, 1991; Lundgren et al., 1991; Parker et al., 1991)。一方、cdc25プロテインチロシンホスファターゼによる脱リン酸化は正に制御する(Russell and Nurse, 1986; Gautier et al., 1991; Kumagai and Dunphy, 1991)。cdc2プロテインキナーゼの活性は分裂期でピークに達し、ヒストンH1, ラミン(Ward and Kirschner, 1990; Peter et al., 1990)等の核タンパク質のリン酸化をはじめ、分裂期でおこる種々の形態変化を導くマスター因子として機能する。



図A：野生株と *dis* 変異株における分裂期の比較

網かけは染色体、棒はスピンドル。*dis* 変異株では変形した三本の染色体がスピンドル伸長によって極方向に不均等に配置される(Ohkura et al., 1988)。

分裂酵母 *cs dis1* 変異株は分裂期に欠損を持った表現型を示す。非許容温度で、染色体は凝縮して、スピンドルは形成、伸長するが染色体は分離しない(Ohkura et al., 1988)(図A)。非許容温度下 *cs dis1* 変異株ではcdc2キナーゼ活性は上昇して維持されることは(Kinoshita et al., 1991)、*cs dis1* 変異株は分裂期へ進行するが、そこから間期へ移行できないことを示唆するものと考えられる。別の表現型は人工ミニ染色体を許容温度ですら高頻度で欠落することである(Ohkura et al., 1988)。類似した表現型を示すほかの *dis* 変異、*dis2* そして *dis3* 変異も単離された(Ohkura et al., 1988)。これら *dis* 変異間の二重変異は許容



温度で致死になるので、これら三つの*dis*<sup>+</sup>遺伝子は重複した必須な機能を有するのかもしれない。*dis2*<sup>+</sup>遺伝子は哺乳類I型プロテインホスファターゼと極めて高い類似性を示すポリペプチドをコードすることがわかった(Ohkura et al., 1989)。*dis3*<sup>+</sup>遺伝子は生育に必須で、核に多い110 Kdのポリペプチドをコードすることがわかった(Kinoshita et al., 1991)。*dis3*<sup>+</sup>遺伝子の機能はわかっていないが、出芽酵母のプロテインホスファターゼSIT4ならびにプロテインキナーゼの調節サブユニットBCY1に関連すると思われるSSD1/SRK1(Sutton et al., 1991; Wilson et al., 1991)に類似性のあるアミノ酸配列を持つ。

タンパク質のリン酸化/脱リン酸化反応は生体内の殆どすべての可逆的なプロセスで利用されている。タンパク質の主要なリン酸化は、プロテインチロシンキナーゼによってチロシン残基で、そしてプロテインセリン/スレオニンキナーゼによってセリン/スレオニン残基でおこる。セリン/スレオニンのアルコール性水酸基とチロシンのフェノール性水酸基の構造的違いから、プロテインキナーゼは一方のみをリン酸化するという仮定のもとにこのような分類がなされた(Hanks et al., 1988)。しかし、G2期から分裂期への進行を負に制御するwee1プロテインキナーゼをはじめ(Featherstone and Russell, 1991)、最近のいくつかの報告は三種の水酸化アミノ酸(チロシン、セリン、スレオニン)をリン酸化する新しいクラスの二重特異性(dual specific)プロテインキナーゼの存在を示唆した(reviewed in Lindberg et al., 1992)。

逆に、脱リン酸化を担う酵素、プロテインホスファターゼも大きく二種(プロテインセリン/スレオニンホスファターゼ、プロテインチロシンホスファターゼ)に分類される(Cohen, 1989)。プロテインセリン/スレオニンホスファターゼは基質特異性、二価陽イオン要求性、阻害剤への感受性からI型、IIA型、IIB型、IIC型の四種に分類される(Cohen, 1989)。分裂酵母ではI型プロテインホスファターゼは*dis2*<sup>+</sup>, *sds21*<sup>+</sup>遺伝子によってコードされており(Ohkura et al., 1989)、IIA型プロテインホスファターゼは*ppa1*<sup>+</sup>, *ppa2*<sup>+</sup>遺伝子によってコードされる(Kinoshita et al., 1990)。これらの遺伝子の欠失あるいは変異は細胞周期進行に欠損をしめす。分裂酵母のプロテインチロシンホスファターゼはcdc2プロテインキナーゼに特異的なcdc25プロテインチロシンホスファターゼをはじめ(Russell and Nurse, 1986)、*pyp1*<sup>+</sup>, *pyp2*<sup>+</sup>, *pyp3*<sup>+</sup>遺伝子(Millar et al., 1992; Ottilie et al., 1992)によってコードされており、これらの遺伝子の欠失あるいは変異も細胞周期進行に欠損をしめす。IIA型プロテインホスファターゼはチロシンリン酸化によって、その活性が制御されることがin vitroでしめされた(Chen et al., 1992)。

リン酸化/脱リン酸化反応はキナーゼ/ホスファターゼ自身の制御機構であると同時に、細胞内プロセスの主要なシグナル伝達機構である。

*cs dis1*-288変異を相補するゲノムDNA断片をクローンすることで*dis1*<sup>+</sup>遺伝子を単離しようとしてきた。その過程で、八個のマルチコピーサプレッサー遺伝子を単離した(Takeuchi 1989)。塩基配列決定により、強い相補能のサプレッサー遺伝子の一つが蛋白質キナーゼ*dsk1*<sup>+</sup>(*dis1*-suppressing protein kinase)をコードすることがわかった。ここで、*dsk1*キナーゼの生化学的特徴および*dsk1*キナーゼの細胞周期制御に関する証拠を示す。

## 結果

*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子はプロテインキナーゼホモログをコードする

分裂酵母*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子は低温感受性*cs dis1*-288変異(Ohkura et al., 1988)のマルチコピーサプレッサーとして単離された。マルチコピープラスミドpDS113(*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子を含む)を持った*cs dis1*-288変異株は、非許容温度22°Cで正常に生育した(図1)。全ての*cs dis1*変異はレスキューされるので、このプラスミドの相補性は変異座位特異的ではない(表1)。

サブクローニングから2.5Kb PvuII-BglII断片を含むプラスミドpDS113-6が*cs dis1*-288変異を相補することが分かった(図1)。このDNA断片の塩基配列を調べたところ、1.6KbのORF(open reading frame)があることが分かった(図1で矢印でしめされている)。その予想されるアミノ酸配列は544残基(予想分子量61.071 Kd)からなる(図2)。予想される開始コドンの近傍上流に同じ読み枠で終始コドンが含まれる。コード領域内にはイントロンのコンセンサスはない。相補に必須なNdeI, SacI, MluI 制限酵素部位はコード領域内にある(図2)。プロテインデータベースの検索から種々のプロテインキナーゼとの相同性が明かになった。すなわち、プロテインキナーゼの触媒部位を形成する11個のサブドメイン共通配列を持つ(図3)。この遺伝子を*dis1*-suppressing kinase 1ということから*dsk1*<sup>+</sup>と名づけた。*dsk1*キナーゼの触媒部位はプロテインセリン/スレオニンキナーゼ(Hanks et al., 1988 and 1991)に類似性を示すが、最も高い相同性を示す出芽酵母YAK1(Garret et al., 1989 and 1991)、マウスCLK/STY(Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991)ですら、キナーゼドメイン内でそれぞれ33% (269アミノ酸中)、27%(331アミノ酸中)に過ぎない(図3)。*dsk1*はキナーゼサブドメインVIとVIIの間に125アミノ酸からなる極めて親水性(18%セリン、9%スレオニン、10%プロリン)なスペーサー配列を持つ(図3下)。類似した構造を持つプロテインキナーゼはまだ報告されていない。しかし、このスペーサー領域を欠失させた*dsk1*を発現するプラスミド(pDS113-9)も*cs dis1*変異を相補できるので(図1)、スペーサー領域は*dsk1*の機能に必須ではないかもしれない。しかし、後述するが、このスペーサー領域は*dsk1*の核内移行に関与するらしい。また、キナーゼサブドメインVIIのDFG保存配列がDLGとなっており、同じ置換はヒトwee1(Igarashi et al., 1991)、線虫daf-1(Georgi et al., 1990)に見られる。キナーゼドメイン以外のC末端側のアミノ酸配列と有意な相同性を示す既知の配列は検出できなかったが、N末端のMGSDGSSは高等真核生物のミリスチン酸化のコンセンサス配列に相当する(Gordon et al., 1991)。

*dsk1*<sup>+</sup>コード領域を用いたゲノムサザンハイブリダイゼーションは緩い条件でも予想される大きさの1セットのバンドを検出したことから、*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子はゲノム上に1コピーあると考えられる(図4)。尚、同条件で出芽酵母に対してゲノムサザンハイブリダイゼーションを行ったが、有意なバンドを検出できなかった(図4)。

*dsk1*<sup>+</sup>コード領域を分裂酵母ADHプロモーター(Russell and Hall, 1983)につなげ構成的発現を行なった。このプラスミドpADH(*dsk1*)はアミノ末端23アミノ酸を欠いた*dsk1*を発現するが、*cs dis1*-288変異を相補する(図1)。



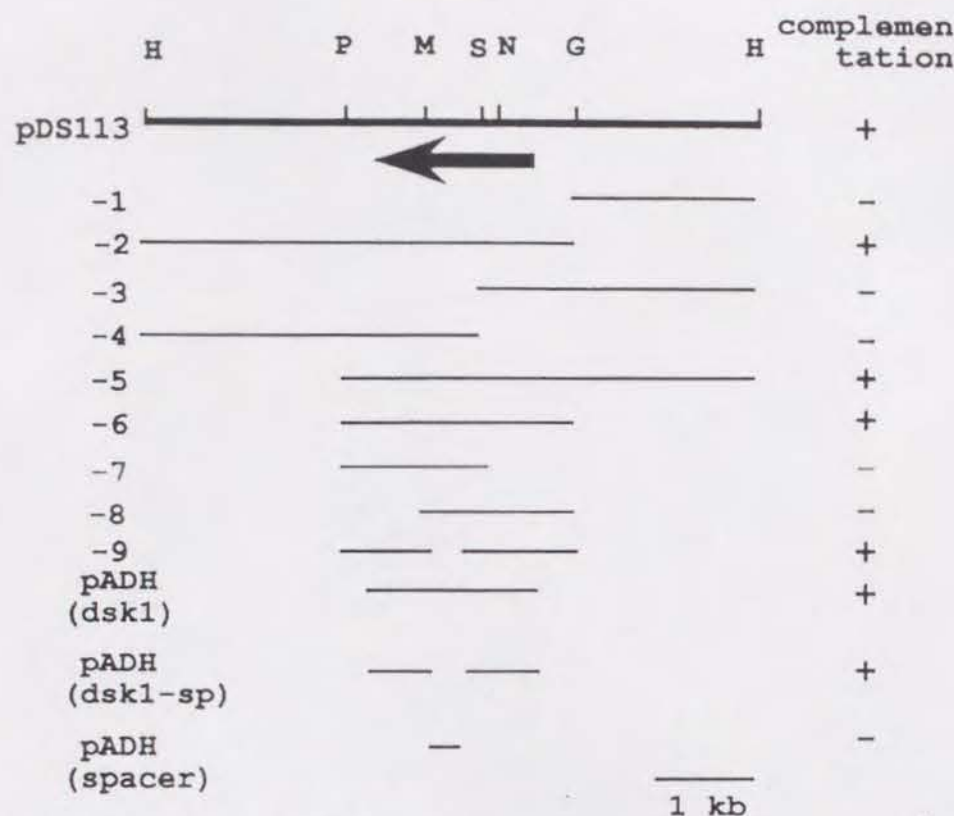


図1: dsk1<sup>+</sup>遺伝子のサブクローニング

dsk1<sup>+</sup>遺伝子を含む(矢印)プラスミドpDS113はcs dis1-288変異を相補する(+で示した)。pDS113 から種々のサブクローニングをおこなった。pADH(dsk1), pADH(dsk1-sp), pADH(spacer)は分裂酵母ADHプロモーター(Russell and Hall, 1983)に、それぞれdsk1+遺伝子、スパーサー領域を欠いたdsk1+遺伝子、スパーサー領域をつないだ。制限酵素部位; G, BglII; H, HindIII; M, MluI; N, NdeI; P, PvuII; S, SacI。

	vector	pDS113-6	pDS113-9	pADH(dsk1)
dis1-80~945 (9 alleles)	-/-	+/+	+/+	+/+
Δdis1C	-/-	+/+	+/+	+/+
Δdis1	-/-	+/+	+/+	+/+
Δdis1Δdsk1	-/-	+/+	+/+	+/+

表1: マルチコピーdsk1<sup>+</sup>遺伝子は全てのcs dis1変異を相補する

22°C, YPDプレートに植えて、4日間保温した。dis1-80~945はスクリーニングで単離されたdis1-80, -105, -203, -288, -341, -615, -804, -909, -945の9個の低温感受性変異株(Ohkura, 1986)。Δdis1Cはdis1<sup>+</sup>遺伝子のC末側を欠失した低温感受性変異株。Δdis1はdis1<sup>+</sup>遺伝子のほぼ全長を欠失した低温感受性変異株(Kurooka, 1992)。

CTTCCTAATGCCGAAAGTTTCCTCGGTAGTGTGCTAAGACTCCACGGTGTTCCTCGGTGATTTCGC -154  
 ACTAAAAATACTACTCCATACCGTATTTATAACGAGAACAAACAACAACGAAGGATTGGTGTGTA -84  
 TTCACATATCTCAGATATTTTAAATTTAAGAGCTGGAGGGACATATCAGTAGTTTCTTCATACGGGGCAGC -14  
 CAGCCATTTTGAATGGGAAGTGACGGGTGCGAGTTTGTACCGGAAAGTGTACACCGGGACACACTGAA 57  
 M G S D G S S L S P K V S Q P G H T E 19  
 TthIII  
 ATAGTTGACCATGTCTCAGTGAAGAGGTGATCAGCAATGGAAGAAATGTTAATAAAGGTCAATTCTGAAG 127  
 I V D H V S E K V I T N G K N V N K K V N S E V 43  
 TAGACGGAAGCATGGTGGAAAGGTAAAAACGCAAGAAATGCAGAGGACTATCACTATGGTGG 197  
 D G K S M V E K V K T H E E N A E D Y H Y G G 86  
 ATACCACCCAGTCTACATTGGTGAAGAAATTCATCACCCTCGATATGTCGTTGAAAGAAATAGGCTGG 267  
 Y H P V Y I G E E F H H R R Y V V E R K L G W 89  
 NdeI  
 GGACATTTTCAACGGTTTGGCTTGCATATGATCGAGCTGCCAAGCGGAGAGTAGCTTTGAAGGTGGTGC 337  
 G H F S T V W L A Y D R A A K R R V A L K V V R 113  
 GTTCAGCAGAGCACTATCGAGAGACCTCAATTGATGAAATTCGCATTITGCAGAAATAGAGAAGGGGA 407  
 S A E H Y R E T S I D E I R I L Q K I R E G D 136  
 CGAAAGCATTTGGGCAAGCATATCATTCTTTGCTCGATTATTTGTGCATCGTGGTCTCAATGGA 477  
 E K H L G K K H I I S L L D Y F V H R G P N G 159  
 SacI  
 GCTCATGTCTGTATGTTTCAAGATTCTCGGTGAGAATCTTTAAGTTTGATACAGTCATACGGCCATC 547  
 A H V C M V F E V L G E N L L S L I Q S Y G H R 183  
 GAGGAGTACCTGTGGTATTGTAAAGCAAAATTCCTACCAATTACTCATCGCTCTGGATTACTTGCATCG 617  
 G V P V G I V K Q I A Y Q L L I A L D Y L H R 206  
 EcoT22I  
 AGAATGCGGGATCATTACTATGATCTTAAACCCGAAATGTTTAAATATGATTGATCAGGATGCCTTG 687  
 E C G I I H T D L K P E N V L I C I D Q D A L 229  
 CAACATATTGAGGCACCTGCAACAACTTCTCCCCCACTTCTAATACCTCTTCTTCAAAAACAAGAAATA 757  
 Q H I E A P A T T S S P T S N T S S S K T R N N 253  
 AACTGTTTATACAGCCAAAGCTCCAATTATTAACGTTGGCAATCTGTAGATACTCTGCCAAGAAGC 827  
 T G Y T A K A P I I K R G Q S V D N S A Q E R 276  
 CAAGACATTGCAAAAAATCCAATAAGAAATCTAAGCCTGCTGGCCAGGTCTTCTAGCAGCTCTTTT 897  
 K T F A K N P T K N S K P A G Q V I P S S P F 299  
 ACTTCCACTTTGAGCCGCTTCTTCTCATTAGAAGGTGCTGTTTCAAGAAATCAGCCCTCGTGAATCTCAA 967  
 T S T L S R F P S L E G A V S E I S L R D S Q K 323  
 HpaI  
 AGCATAATTCTCATCTAATTCTCCGTTTTCTAGTGGAGATAATTCTTATACTGTATGGTGTAAACGG 1037  
 H N S H P N S P F S S G D N S L I L D G V N G 346  
 MluI  
 TTCTCAGGAACCCGTTCCAAAAATCACTGTATAAATTGCGGATCTCGGTAACCGCTGCTGGACACGGAAG 1107  
 S Q E P V P K I T V K I A D L G N A C W T R K 369  
 CATTTCAACACGATGTGCAAAACCGTCACTATAGTCTCCAGAAGTAATTCTAGGATGTGCTGGGGAG 1177  
 H F T N D V Q T R Q Y R S P E V I L G C R W G A 393  
 CTTCCGCTGATTGCTGGAGTTTTCCTGTATCATTTTGAATTGCTAACCAGGCTTACCTTTTCGATCC 1247  
 S A D C W S F A C I I F E L L T G D Y L F D P 416  
 ACGGAATGGGAATTCTTATTCTAAGGAGGATGACCAATTGCCCAATTATTGAGTTATTGGTTAATTAT 1317  
 R N G N S Y S K E D D H I A Q I I E L L V N Y 439  
 CCTAAGCAAAATGGCACTTTTCAAGAAAGCACTCCCGGATTTATTAAACCGTGGCGGTGAATCCGAATA 1387  
 P K Q M A L S G K H S R D L F N R R G E L R N I 483  
 TTCATAAATTGAAGTTTGGCCTTTAAAGATGTTTGGAGCAAAATACCATTTTTCAGCCGAGTTGGC 1457  
 H K L K F W P L K D V L E Q K Y H F S A E L A 486  
 TCAACAAATATCAGACTTTTATCTCCTATGTTATGTTTGTATGCTGCAAGCGAACCAGTCTGGTTAC 1527  
 Q Q I S D F L S P M L C F D P A K R T N A G Y 509  
 ATGAGCAATTCTCCATGGTTGCGCGAAGTGGCTGATCCTACGTTCAAAATCGAGACTACTGGAGCAACCG 1597  
 M S N S P W L R E V A D P T F K I E T T G A T G 533  
 GTGAAGATGTACCCGATGGGCTACTGAAATTCGTTAGTGTTTACCTTGATATTGGTTTGAAGCGCTAG 1667  
 E D V P G W A T E I R \* 544  
 EcoRV  
 TAAATGATTTTTTTTATATATAGTTTTTTTGGGATATCGTCCCTTTTAAATTTCCACCATAGCG 1737  
 TGATTGCTTTAAAAAGCATGACACCTTTCACTCTGAATGGGTTACGTATGATTATCAGGATTCCTTCT 1807  
 TTTGATCAACATTTACTGCACTGAAATTTGAACGAAATTTCTTTTACTTAATGAATATTAAGATATAG 1877

図2: dsk1<sup>+</sup>遺伝子の塩基配列

dsk1<sup>+</sup>遺伝子の塩基配列が予想されるアミノ酸配列と共に示されている。重要な制限酵素部位も示されている。



YAK1 352/YILYVNDVLGVE-QNRKYLVLIDILGQGTFGQVVKQN-LLTKEILAVKVVKSRTYLTQS  
 \* \* \* \* \*  
 dsk1 63/YGGYHPVYIGEEFHRRYVVERKLGWGHFSTVWLAYD-RAAKRRVALKVVRSAEHYRETS  
 \* \* \* \* \*  
 CLK 144/DEEGHLCQSGDVLSARYEIVDTLGEAGFKVVECIDHKVGRRVAVKIVKNVDRYCEAA  
 I II

ITEAKILELLNQKID-PTNKHFLRMYDSFVHK----NHLCLVFELLSNNLYELLKQNKF  
 \* \* \* \* \*  
 IDEIRILQKIREGDEKHLGKKHIIISLLDYFVRGPNGAHVCMVFEVLGENLISLIQSYGH  
 \* \* \* \* \*  
 QSEIQVLEHL-NTTDPH-STFRVQMLEWFEHR----GHICIVFELLGLSTYDFIKENSEF  
 III IV V

HGLSIQLIRTFTTQILDSL-CVLKESKLIHCDLKPENILLC-APD-----KPELKIID  
 \* \* \* \* \*  
 RGVFVGIVKQIAYQLIALDYLRHRCGIIHTDLKPENVLICIDQD(-125-)KITVKIAD  
 \* \* \* \* \*  
 LPFRMDHIRKMAQICKSVNLFHSN-KLTHTDLKPENIL----- (26) -----KVVD  
 VIa VIb

FGSSCEEARTVYTYIQSRFYRAPEIILGIPYSTSIDMWSLGCIVAEFLGPIF--PGAS  
 \* \* \* \* \*  
 LGNACWTRKHFTNDVQTRQYRSPEVILGCRWGASADCWSFACIIFELLTGDYLFDPNRGN  
 \* \* \* \* \*  
 FGSATYDDEHHSTLVSTRHYRAPEVILALGWSQPCDVWSIGCILIEYYLGFTVF-PTHDS  
 VII VIII IX

EY-----NQLTRIIDLGYPPSWMIDMGKNSGKFMKK----- (70) -----  
 \* \* \* \* \*  
 SYSKEDDHIAQIIELLVNYPKQMALSGKHSRDLFNRRGELRNHKL-KFWPLKDVLEQKY  
 \* \* \* \* \*  
 R-----EHLAMMERILGPLPKHMIQKTRKRYFHHDRLDWDEHSSAGRYVSRCKPLKEF  
 X

-----LIHFLGGVNLNPLER/127  
 \* \* \* \* \*  
 HFSAEALAQQ-ISDFLSPMLCFDPAKR/ 39  
 \* \* \* \* \*  
 MLSQDAEHEFLFDLVGKILEYDPAKR/ 18  
 XI

SPACER  
 - . . . . . + . . + + . - + + . + . + .  
 ALQHIEAPATTSSPTSNTSSSKTRNNTGYTAKAPIIKRGQSVDNSAQERKTFKNPTKNSKPAGQVIPS  
 . . . . . + . . - . + . . . . .  
 SPFTSTLSRFPSELEGAVSEISLRDSQKHNSHPNSPFSSGDNLSILDGVNGSQEPVP

図3: dsk1とプロテインキナーゼのホモロジー  
 dsk1, 出芽酵母YAK1(Garret et al., 1989 and 1991), マウスCLK/STY(Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991)の  
 アミノ酸比較。同一アミノ酸は\*で示されている。I-XIはキナーゼ触媒ドメイン(Hanks et al., 1991)。dsk1  
 のスペーサー配列も示されている。点はセリン、スレオニン残基。-, +はそれぞれ酸性、塩基性アミノ酸。  
 MAP キナーゼのコンセンサス配列(Clark-Lewis et al., 1991)に相当するセリン残基を白抜きで示した。



図4: 分裂酵母及び出芽酵母に対するdsk1\*遺伝子のゲノムサザンブロット  
 レーン1-3は分裂酵母野生株のゲノムDNA。レーン4-7は出芽酵母野生株Sp1のゲノムDNA。レー  
 ン1と4、レーン2と5、レーン3と6は、それぞれ制限酵素EcoRI, HindIII, EcoRI-HindIII切断した。ハイ  
 ブリダイゼーション(6xSSC, 5xDenhart's, 100µg/ml ssDNA)は50℃, 一昼夜行ない、洗浄は2xSSC, 0.1%SDSで  
 室温2回、更に、50℃で一回行なった。dsk1\*遺伝子のコード領域1.4 kb NdeI-EcoRV断片をプローブに用い  
 た。分裂酵母ゲノムDNAのEcoRI-HindIII切断断片はdsk1\*遺伝子由来の2.4 kb, 1.3 kb, 0.5 kbのサイズを検出  
 したが、他の有意なものはない。出芽酵母ゲノムDNAで検出したバンドは非特異的であった。

た



dsk1遺伝子破壊株は生育できる

dsk1遺伝子破壊株( $\Delta$ dsk1)は二種類つくられた。挿入変異をつくるために(図5a)、dsk1<sup>+</sup>遺伝子をSacI制限酵素部位で切断して、分裂酵母ura4<sup>+</sup>遺伝子(Grimm et al.,1988)を含むDNA断片が挿入された。また、欠失変異をつくるために(図5b)、0.7Kbコード領域をura4<sup>+</sup>遺伝子で置換した。線状化されたこれらのDNA断片を用いて、二倍体株TP6Dのゲノム上のdsk1<sup>+</sup>遺伝子を置換した。得られたヘテロ接合型ura<sup>+</sup>二倍体を胞子形成させたところ、4個の胞子すべてが出芽し、コロニーを形成した。このことから、dsk1<sup>+</sup>遺伝子は生育に必須ではないことがわかった。

dsk1<sup>+</sup>遺伝子が実際に染色体上で破壊されていることを確かめるために、ura<sup>+</sup>二倍体及び一倍体のゲノムDNAに対するサザンブロットを行った(図5c)。二倍体及び一倍体で破壊遺伝子由来の予想される大きさの制限酵素断片が得られた(詳しくは図注)。dsk1遺伝子破壊株( $\Delta$ dsk1)とcs dis1-288変異株の交配からこれら二つの遺伝子座位が連鎖していないことが分かった。この二重変異株( $\Delta$ dsk1cs dis1-288)は生育でき、cs dis1-288変異株に類似の表現型をしめす。dis1<sup>+</sup>遺伝子の欠失株( $\Delta$ dis1)は33°Cでは正常に生育するが、22°C(低温)では致死となり、dis表現型を示す(Kurooka 1992)。このDdis1変異株のcs(低温感受性)もマルチコピー-dsk1<sup>+</sup>によって相補される(表1)。以上のことは、dsk1<sup>+</sup>遺伝子はcs dis1変異のマルチコピーサプレッサーであり、dis1変異をバイパスしていることを示唆する。dsk1<sup>+</sup>遺伝子は第二染色体の2000 Kb Not I断片上にマップされた(Takeuchi,1989)。dis1<sup>+</sup>遺伝子座位は第三染色体、短腕部にマップされた(Kurooka, 1991)。

一倍体 $\Delta$ dsk1(h<sup>-</sup>leu1 ura4 dsk1::ura4<sup>+</sup>)変異株は33°Cで正常に発芽し、最小培地で野生株(1世代2.5 時間)より幾分遅く生育する(1世代3時間)。 $\Delta$ dsk1変異株の平均細胞長は野生株と同じである。野生株と $\Delta$ dsk1変異株のDAPIによる核染色像が示されている(図5d)。

dsk1<sup>+</sup>遺伝子は二種の移動度の近い、分子量~60 Kdの蛋白質を産する。

dsk1<sup>+</sup>遺伝子産物を分裂酵母内で同定するために、ウサギ抗dsk1抗体を作成した。二種のポリペプチド(アミノ末端を欠いた60 Kdポリペプチド、スパーサー領域からなる16 Kdポリペプチド)を大腸菌で大量調製して抗原として用いた。分裂酵母細胞抽出液を調製し、SDS-PAGEに流して、アフィニティ精製した抗dsk1抗体を用いてイムノブロットをおこなった。dsk1ポリペプチドは移動度の近い二種のバンド(61 Kd, 63 Kd)として検出された(図6aで二本線でしめされている)。非特異的なバンドもあるが、これら二つのバンドは $\Delta$ dsk1変異株細胞抽出液では完全に消失した(レーン1)。完全培地YPD,最小培地EMM2で対数増殖した野生株において、移動度の大きいバンド(61 Kd)の強度は移動度の小さいバンド(63 Kd)より強い(レーン4)。最初に単離されたマルチコピープラスミドpDS113及び最小相補断片を含むマルチコピープラスミドpDS113-6を持った野生株及びDdsk1変異株で、61,63 Kdのバンドの強度は増加した(レーン2,3,5)。従って、これら二種のバンドはdsk1<sup>+</sup>遺伝子由来であると結論した。スパーサー領域16 Kdを抗原にして作

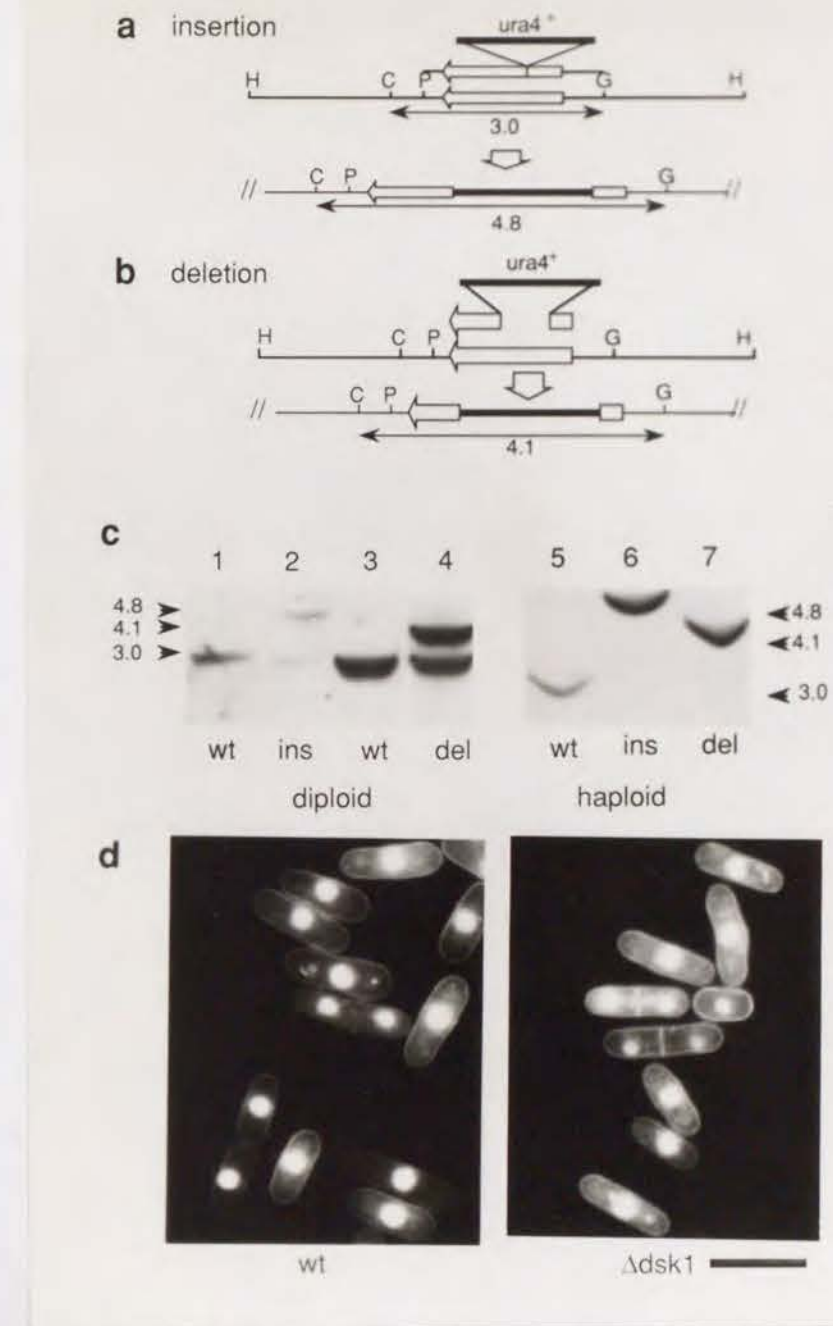


図5：dsk1<sup>+</sup>遺伝子破壊

(a)挿入破壊。dsk1<sup>+</sup>遺伝子を含む線状PvuII-BglII断片をSacIで切断して、ura4<sup>+</sup>遺伝子を挿入、分裂酵母細胞を形質転換した。破壊された遺伝子は二倍体二重TP6D(h<sup>+</sup>/h<sup>-</sup> leu1/leu1 his2/+ ade6-210/ade6-216 ura4/ura4)の染色体上に相同組み換えによって挿入された。(b)欠失破壊。dsk1<sup>+</sup>遺伝子内の0.7 kbコード領域を欠失させて、ura4<sup>+</sup>遺伝子を挿入した。ヘテロ接合型Ura<sup>+</sup>二倍体を胞子形成させた。どちらの場合も、四つの胞子は生育した。(c)dsk1<sup>+</sup>遺伝子のコード領域PvuII-BglII断片をプローブにしたゲノムサザンハイブリダイゼーション。ゲノムDNAをClaI-BglII切断した。レーン1、3は二倍体TP6D;レーン2はdsk1<sup>+</sup>遺伝子が挿入破壊されたヘテロ接合型Ura<sup>+</sup>二倍体。4.8 kbのバンドが別に在った;レーン4はdsk1<sup>+</sup>遺伝子が欠失破壊されたヘテロ接合型Ura<sup>+</sup>二倍体。4.1 kbのバンドが別に在った;レーン5は一倍体野生株;レーン6は一倍体挿入破壊株;レーン7は一倍体欠失破壊株。予想された大きさの断片が検出された。(d)DAPI染色。左のパネルは野生株;右のパネルはdsk1<sup>+</sup>遺伝子破壊株( $\Delta$ dsk1)。棒は10 $\mu$ m。



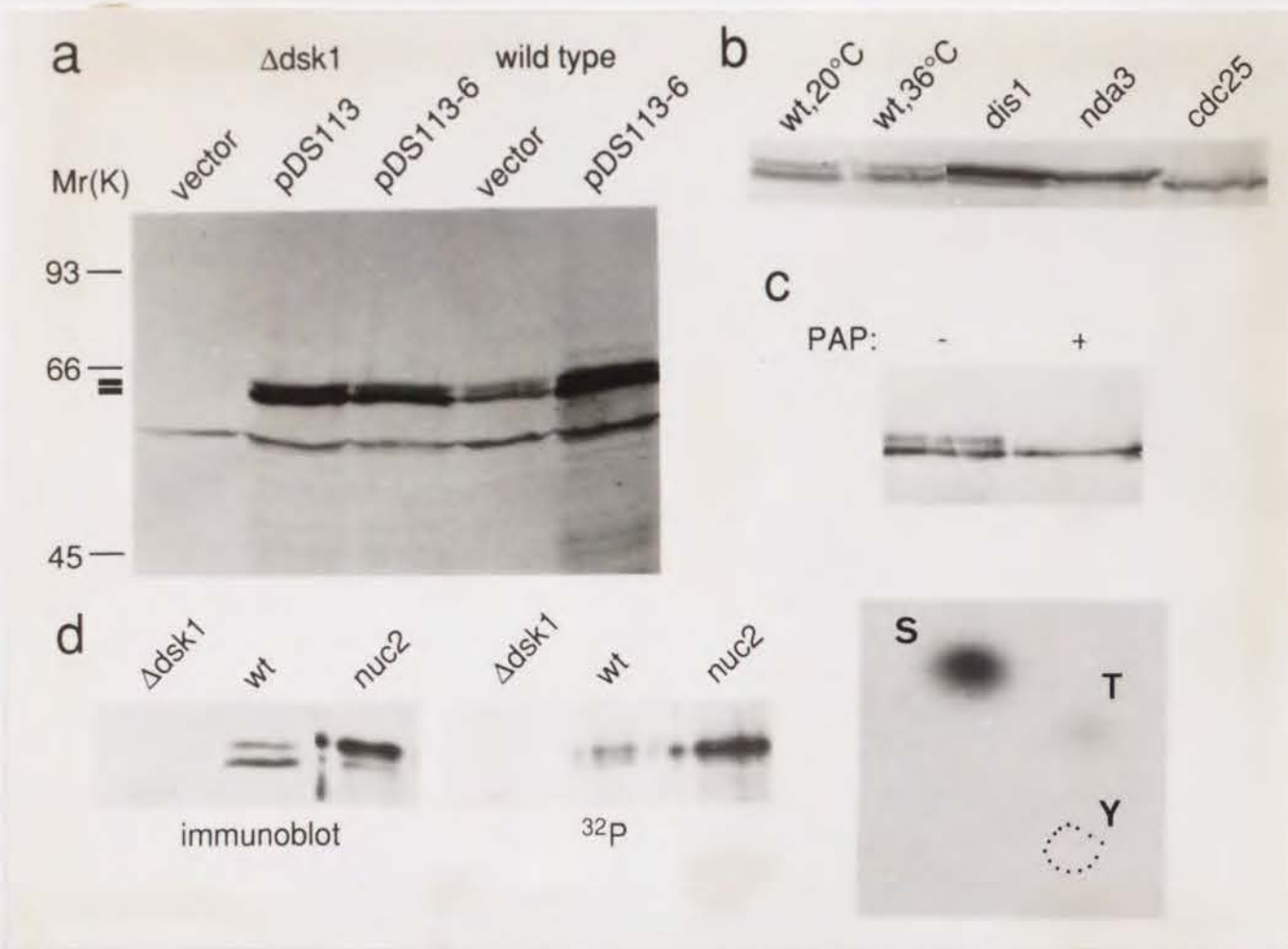


図6: dsk1ポリペプチドの同定とリン酸標識

(a)野生株及びDdsk1株の細胞抽出液をSDS-PAGEして、抗dsk1抗体でイムノブロットをした。レーン1-3;ベクタープラスミド、dsk1+遺伝子を含むマルチコピープラスミド、pDS113,pDS113-6をもったDdsk1株。レーン4、5;ベクタープラスミド、pDS113-6をもった野生株。dsk1+遺伝子の発現に依存したバンドが二本線で示されている。一本の非特異的なバンドが全ての抽出液で検出された。分子量マーカーの位置も示されている。

(b)野生株及び変異株の細胞抽出液をSDS-PAGEして抗dsk1抗体でイムノブロットした。dis1,nda3;20°C,8時間培養して分裂期停止したdis1,nda3変異株(野生株の20°Cでの世代時間は5-6時間)。cdc25;36°Cで4時間培養してG2期停止したcdc25-22変異株。wt,20°C,wt,36°C;同様に処理した野生株。移動度の小さいバンドがdis1,nda3変異株で顕著で、移動度の大きいバンドはcdc25変異株で顕著であった。(c)野生株のdsk1免疫複合体を酸性ホスファターゼ(PAP)で処理(+/-、未処理)、その後SDS-PAGEして抗dsk1抗体でイムノブロットした。移動度の小さいバンドはPAP処理後消失した。(d)Δdsk1変異株、野生株、nuc2変異株を<sup>32</sup>P無機リン酸を含んだEMM1培地でまず26°Cで培養して、36°C(nuc2変異株の制限温度)に移した。<sup>32</sup>P標識された細胞抽出液を調整して、抗dsk1抗体で免疫沈降して、SDS-PAGE後、抗dsk1抗体でイムノブロット(左パネル)及びオートラジオグラフィーした。標識されたバンドをゲルから電気泳動で抽出して、酸加水分解後、薄層クロマトグラフィーした。強いリン酸化セリンのスポットと弱いリン酸化スレオニンのスポットが検出されたが、リン酸化チロシンは検出されなかった。

成した抗体も同じイムノブロットバンドを得たので、スパーサー構造は確かにdsk1ポリペプチド内に存在することを示す。

dsk1はリン酸化蛋白質であり、種々の細胞周期変異株でそのリン酸化状態が変動する。

二種のバンドの相対的な強度は異なる変異株細胞抽出液で著しく変動する。三つの変異株の例が20°Cあるいは36°Cで同様に培養した野生株コントロールと一緒に図6bに示されている。分裂期停止したdis1-288,nda3-311,nuc2-663変異株の抽出液では移動度の小さい63 Kdバンドが主要で、G2期停止したcdc25-22変異株では移動度の大きい61 Kdバンドが主要であった。cdc25-22変異株と同じパターンがcdc2-33変異株でも得られた。

しかしながら、同様に処理した野生株は二種のバンドの強度変化を示さなかったもので、上で示した変化は温度効果によるものではない。

次に、上述したdsk1バンドの移動度の違いはリン酸化によるものであることをみつけた。dsk1免疫複合体を野生株から調製して、酸性ホスファターゼ(PAP;potate acid phosphatase)処理して、SDS-PAGEに流して同じ抗体でイムノブロットを行った。移動度の小さい63 Kdバンドは酸性ホスファターゼ処理後完全に消失する(図6c,+PAP処理、-PAP未処理)。それゆえに、SDS-PAGE上で移動度の小さいdsk1バンドはリン酸化による。

dsk1蛋白質がリン酸化されていることを直接的に示すために、分裂酵母細胞を無機リン酸でin vivo標識して、dsk1免疫複合体を調製した。Δdsk1株、野生株、nuc2変異株を26°Cで培養して、36°C(nuc2変異株の非許容温度)に移して無機リン酸存在下で5時間培養した。各細胞抽出液からdsk1免疫複合体を調製してSDS-PAGE後オートラジオグラフィーをした(図6d)。左のパネルは抗dsk1抗体によるイムノブロット。分裂期停止したnuc2変異株(Hirano et al., 1988)では移動度の小さいバンドが主要で<sup>32</sup>P標識が強調された(中のパネル)。コントロールとして、Δdsk1変異株からは<sup>32</sup>P標識されたバンドは検出されなかった。このように、dsk1はリン酸化蛋白質であり、移動度の小さいバンドは過剰なリン酸化状態をしめす。オートラジオグラフィーで61 KDバンドが弱いながら検出されるので、野生株での移動度の大きいバンドもリン酸化されているかもしれない。dsk1の<sup>32</sup>P標識実験をcdc25-22変異株を用いて同様に行ったが、cdc25-22変異株はリン酸含量の低いEMM1培地中では許容温度での生育も悪く、非許容温度下で変異表現型が十分でなかった。

リン酸化アミノ酸を決めるために、<sup>32</sup>P標識したdsk1バンドをSDS-PAGEから切り出し、酸加水分解後、薄層クロマトグラフィーで展開した。リン酸化セリンの強いスポットとリン酸化スレオニンの弱いスポットを検出したが、リン酸化チロシンは検出できなかった(右パネル)。

#### 細胞周期特異的なdsk1のバンドシフト

dsk1蛋白質のリン酸化は細胞周期特異的なのか、すなわち、野生株の正常な細胞周期におけるG2,分裂期でdsk1のバンドの強度は変わるのか?野生株の同調培養を行い、抗dsk1抗体によるイムノブロットでdsk1バンドパターンをモニターした(図7a)。完全培地



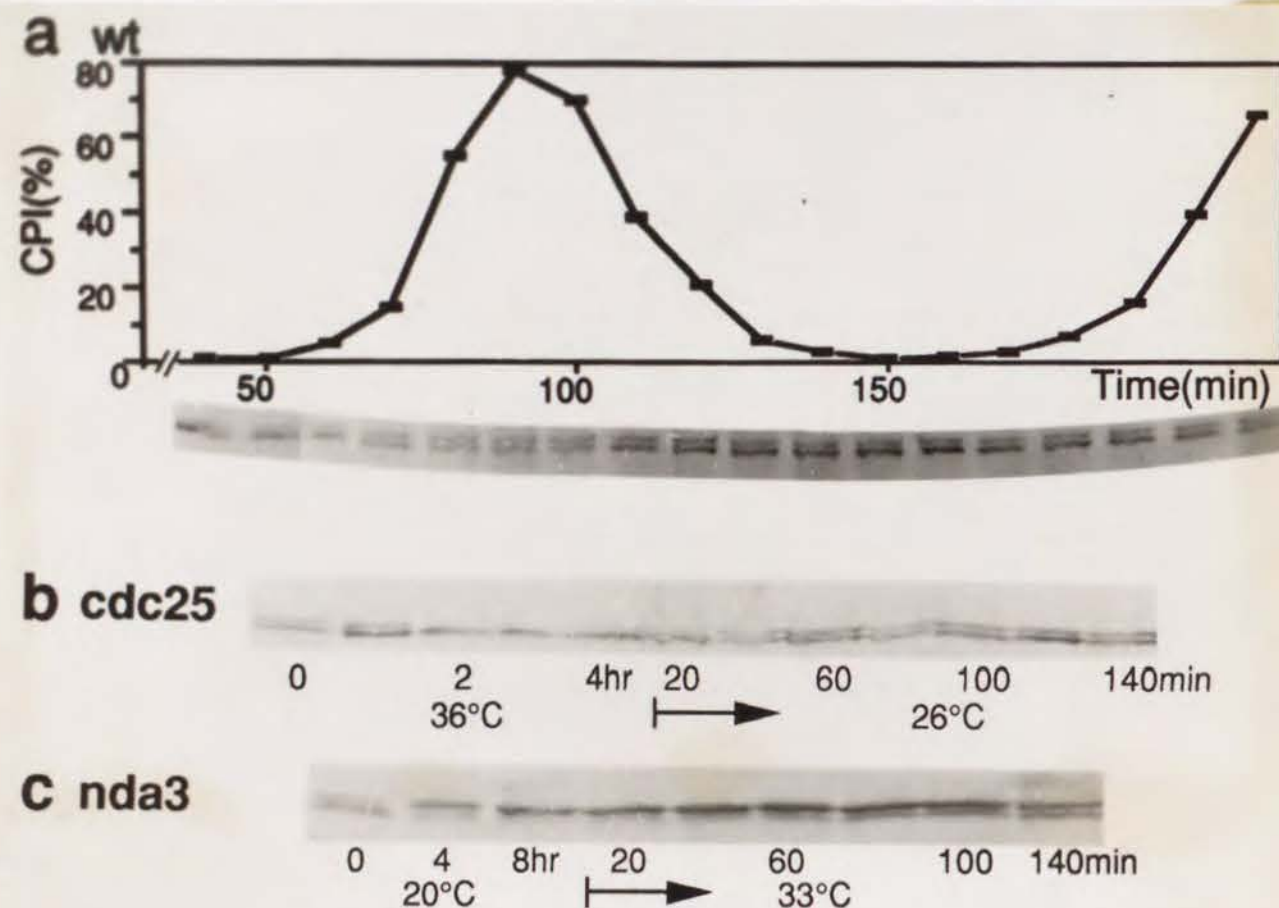


図7：野生株及び変異株でのdsk1プロテインのバンド強度比

(a)対数増殖期の野生株をエリュートリーターローターでG2初期の細胞を分画して、33°C、YPD培地で同調培養をおこなった。隔壁をもった細胞を数えた(CPI)。細胞を10分ごとに集めて、抽出液を調整、SDS-PAGE、抗dsk1抗体でイムノブロットした。高いCPIを示す分裂期で移動度の小さいバンドの比が高い。(b)26°C、EMM2培地で培養したcdc25-22変異株を36°C(制限温度)に移して、4時間培養後、再び26°Cに移した(矢印で示した)。示された時間で細胞を集めて、抽出液を調整して、抗dsk1抗体でイムノブロットした。移動度の大きいバンドが36°C、4時間で顕著になり、26°Cに移して移動度の小さいバンドもあらわれた。(c)33°C、YPD培地で培養したnda3-311変異株を20°C(制限温度)に移して、8時間培養後、再び33°Cに戻した(矢印で示した)。示された時間で細胞を集めて、抽出液を調整、抗dsk1抗体でイムノブロットした。移動度の小さいバンドが20°C、8時間で顕著になるが、33°Cに移して移動度の大きいバンドもあらわれた。

YPDで培養した一倍体野生株をベックマンエリュートリーターローターで分画して、G2初期の短い細胞を集めて33°Cで培養した。高い同調性が得られた(Cell plate index; CPI) (上のパネル)。dsk1の移動度の小さいバンドの相対比が分裂期で高く、その他のステージでは弱い(下のパネル)。しかしながら、これらの変化は微小で、明確ではなかった。

つぎに、許容温度(26°C)で培養したcdc25-22変異株を非許容温度(36°C)に移して4時間培養した(Moreno et al., 1989)。予想されたように、移動度の大きいバンド強度が増大した(図7b)。細胞を許容温度(26°C)に移して、細胞周期を進めると、移動度の小さいバンドの強度が急速に増大した。

また、許容温度(33°C)で培養したnda3-311変異株を非許容温度(20°C)に移して8時間培養すると、移動度の小さいバンドの強度が増大するが、許容温度(33°C)に移して細胞周期を進めると、移動度の大きいバンドの強度が増加する(図7c)。許容温度に移すと、移動度の大きいバンドの強度が増大した。野生型dsk1バンドパターンとの違いは細胞周期停止によって引き起こされる。他の細胞周期変異株、すなわち、G1期停止cdc10(Nurse et al., 1976), S期停止cdc17(Nasmyth et al., 1981), M期停止nuc2(Hirano et al., 1988)も調べたが、移動度の大きいバンドははじめの二つの変異株で増大し、移動度の小さいバンドはnuc2変異株で増大する。従って、移動度の小さいバンドはM期停止した細胞でのみ主要なバンドとなる。

#### In vitroでのdsk1の蛋白質セリン/スレオニン/チロシン-自己リン酸化

dsk1<sup>+</sup>遺伝子産物がタンパク質キナーゼ活性を持つかどうかをしらべるために、分裂酵母細胞抽出液からdsk1免疫複合体を調製してin vitroキナーゼ活性を分析した。四種の細胞抽出液、すなわち、Δdsk1変異株、野生株(wt)、マルチコピープラスミドpdsk1を持った野生株、定常的過剰発現プラスミドpADH(dsk1)を持ったΔdsk1変異株の細胞抽出液からdsk1免疫複合体を調製した。これら免疫複合体を10mM MgCl<sub>2</sub>存在下でγ-<sup>32</sup>P-ATPと25°C、15分保温した。図8aに示されているように(左; 抗dsk1抗体によるイムノブロット右; オートラジオグラフィー)、dsk1タンパク質はin vitroでリン酸化される。その活性はdsk1タンパク量におおよそ比例する。なお、pADH(dsk1)はアミノ末端23アミノ酸を欠失したdsk1をコードしているために、野生型dsk1と移動度が異なる。次に、リン酸化されたdsk1バンドを切り出して、リン酸化アミノ酸分析をおこなった。リン酸化セリンとリン酸化チロシンが検出された。リン酸化スレオニンはほとんど検出されなかった(図8a, 右パネル)。In vivo標識されたdsk1タンパク質ではリン酸化チロシンは検出されなかった(図6d)、自己リン酸化によるチロシンリン酸化は予期せぬことであった。

次に、大腸菌でつくったdsk1タンパク質(bdsk1)の自己リン酸化能を分析した。大腸菌からdsk1タンパク質を精製、可溶化して、ヒストンH1、γ-<sup>32</sup>P-ATP存在下で、25°C、15分保温した(クーマシー染色が図8bの左パネルに示されている)。bdsk1は自己リン酸化されるが(中パネル)、ヒストンH1はリン酸化されない。<sup>32</sup>P標識された大腸菌dsk1を切り出して、リン酸化アミノ酸分析をおこなった。右パネルに示されているように、リン酸化セリンのスポットが強い。更に、リン酸化スレオニン、リン酸化チロシンのスポットも検出された。分裂



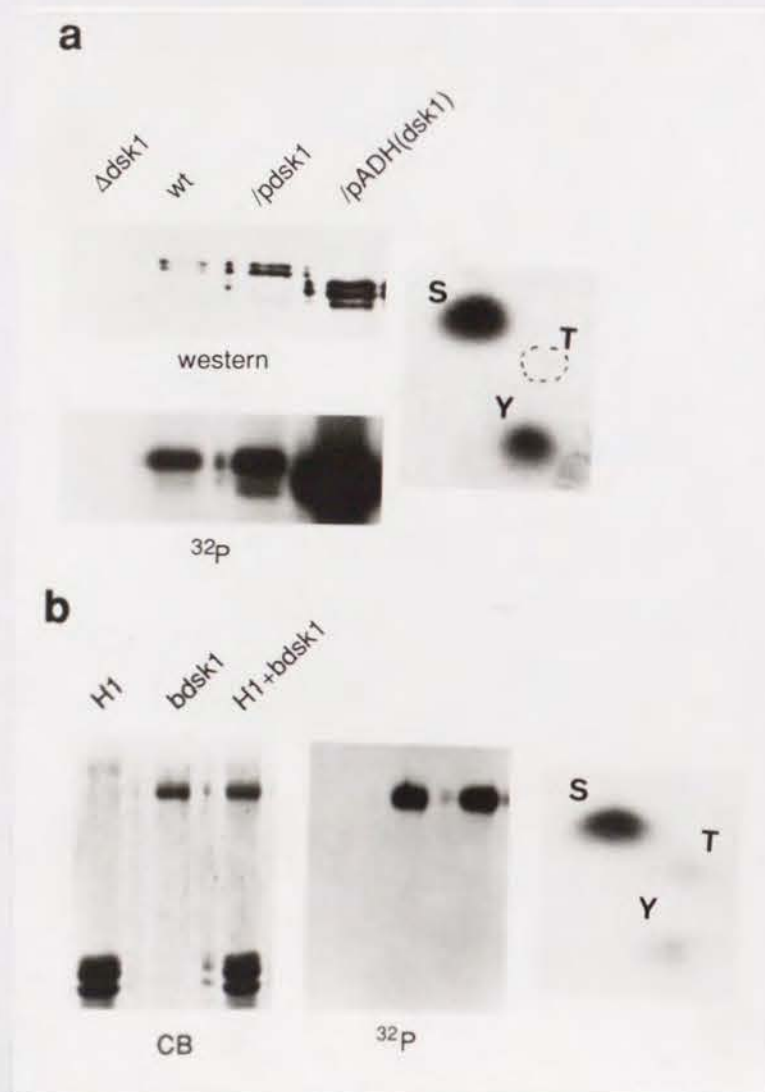


図8：dsk1プロテインのin vitro自己リン酸化

(a)分裂酵母dsk1免疫複合体を $r\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP存在下で保温した。それらをSDS-PAGEして、抗dsk1抗体でイムノブロット(左上パネル)、オートラジオグラフィーした(左下パネル)。Δdsk1, dsk1遺伝子破壊株；wt, 野生株；/pdsk1, マルチコピープラスミドpdsk1をもった野生株；/pADH(dsk1), dsk1\*遺伝子を過剰発現するプラスミドpADH(dsk1)をもったΔdsk1株。32P標識されたdsk1プロテインを電気泳動でゲルから抽出して、酸加水分解後、薄相クロマトグラフィーした。S, リン酸化セリン；T, リン酸化スレオニン；Y, リン酸化チロシン。

酵母由来のdsk1免疫複合体に比して、bdsk1の自己リン酸化で検出されるリン酸化チロシンの量が少ない原因はわからない。In vitro 自己リン酸化反応前のbdsk1タンパク質が抗リン酸化チロシン抗体で認識されるので、bdsk1はすでにチロシンリン酸化されているのかもしれない。自己リン酸化によってdsk1タンパク質の移動度の変化はおきない、おそらく、移動度の変化はin vivoでの特異な部位でのリン酸化によるのであろう。

#### dsk1によるin vitroでのミエリン塩基性タンパク質(MBP)のリン酸化

dsk1がタンパク質キナーゼであることを実証するためには、上述した自己リン酸化以外に、基質を用いたリン酸化反応を検出する必要がある。他のタンパク質キナーゼの基質に用いられる種々のタンパク質がリン酸化されるか調べた。β-カゼイン、ヒストンH1, H2A、酸変性エノラーゼ、ホスホリラーゼb、poly(Glu/Tyr)、アンジオテンシンIIはリン酸化されなかったが、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)はbdsk1同様(図9)に分裂酵母dsk1免疫複合体でもリン酸化された。分裂酵母野生株の細胞抽出液からdsk1免疫複合体を調製して、最終濃度0.5mg/ml MBPと $r\text{-}^{32}\text{P}$ -ATPを0から20分保温した。dsk1の自己リン酸化及びMBPのリン酸化反応は一次反応をしめた(図10a 右パネル)。Δdsk1変異株ではラジオ活性は検出されなかったので、MBPリン酸化能はdsk1タンパク質に依存した(図10a 左パネル)。自己リン酸化を含めdsk1のリン酸化反応は $\text{Mg}^{2+}$ あるいは $\text{Mn}^{2+}$ を必要としたが、 $\text{Ca}^{2+}$ あるいは $\text{Zn}^{2+}$ では置換できなかった。

dsk1タンパク質と15分間保温したMBPをリン酸化アミノ酸分析した。図10bに示されているように、リン酸化セリンの強いスポットとリン酸化スレオニンの弱いスポットが検出されたが、リン酸化チロシンのスポットは検出されなかった。これらの結果はdsk1はタンパク質セリン/スレオニンキナーゼであることを示し、その基質特異性が狭いのかもしれない。

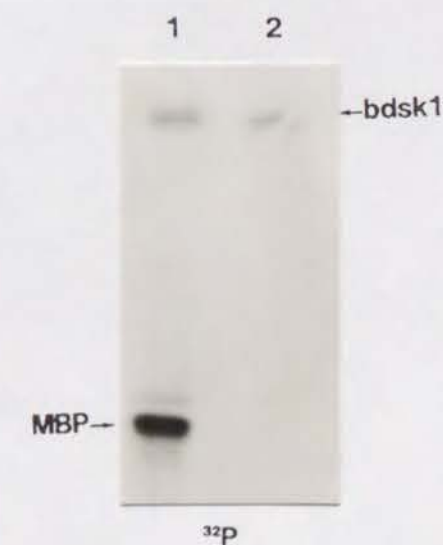


図9：bdsk1によるMBPのin vitroリン酸化

(レーン1)bdsk1とミエリン塩基性タンパク質(MBP, 0.5mg/ml)あるいは、(レーン2)bdsk1のみを $r\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP存在下で25℃, 15分保温した。bdsk1とMBPのリン酸化を検出した。



dsk1の過剰発現によりG2期から分裂期への移行が遅延される

dsk1の過剰発現が細胞生育に影響を与えるかどうかを調べた。dsk1<sup>+</sup>遺伝子を分裂酵母の誘導発現プロモーターnmt1<sup>+</sup>(Maundrell,1990)につなげたプラスミドpNMT(dsk1)を作成した。nmt1<sup>+</sup>の発現は培地からチアミンを除くことで誘導されて、チアミン存在下では抑制される。プラスミドpNMT(dsk1)を持った野生株細胞はチアミン存在下では正常にコロニーを形成するが、チアミン非存在下では微小なコロニーを形成する(図11a)。ベクタープラスミドを持った株は両条件下で正常なコロニーを形成する。dsk1の過剰発現は細胞生育に有害であった。

dsk1タンパク質の発現を調べた。プラスミドpNMT(dsk1)を持った野生株をまずチアミン含最小培地で培養して、チアミンを除いた最小培地に移して18時間培養した。抗dsk1抗体によるイムノプロットに示されているように(図11b,左から0,8,10,12,14,16,18時間)、dsk1<sup>+</sup>遺伝子は10時間で発現しはじめた;12時間には過剰なdsk1タンパク質が存在する。なお、プラスミドpNMT(dsk1)はアミノ末端23アミノ酸を欠失したdsk1タンパク質を発現するために、野生型dsk1と移動度が異なる。この過剰発現によって、細胞の平均長は著しく増加した(図11c,d)。チアミン非存在下13時間で細胞長はチアミン存在下での約2倍であった。一核の細胞の割合は、0時間で80%,12時間で90%,14時間で98%と増加した。同時に、分裂期指数は0時間での12%から14時間での1%に減少した。抗チューブリン抗体TAT-1(Woods et al., 1989)による免疫蛍光像は伸長した細胞が細胞質微小管を持つことを示した(図11d,右パネル;左パネルは同じ細胞のDAPI染色)。スピンドルを持った分裂期細胞は14時間ではほとんど観察されなかった(2%以下)。分裂酵母ADHプロモーター(Russell and Hall, 1983)によってNMTプロモーターより緩和な過剰発現をするプラスミドpADH(dsk1)をもった野生株もG2 DNA含量をもった一核で伸長した表現型をしめした(図11e,ADHでしめされている)(野生株の平均1.4倍)。しかしながら、正常な大きさのコロニーを形成した。

NMT-dsk1を過剰発現している細胞のDNA含量をFACScan分析によって測定した(図12)。G1期停止するcdc10変異株をコントロールとした。プラスミドpNMT(dsk1)を持った野生株はチアミン非存在下14-16時間でもG2 DNA含量をしめした。これらの結果はdsk1を過剰発現している細胞はG2期から分裂期への進行が著しく遅延されることをしめした。

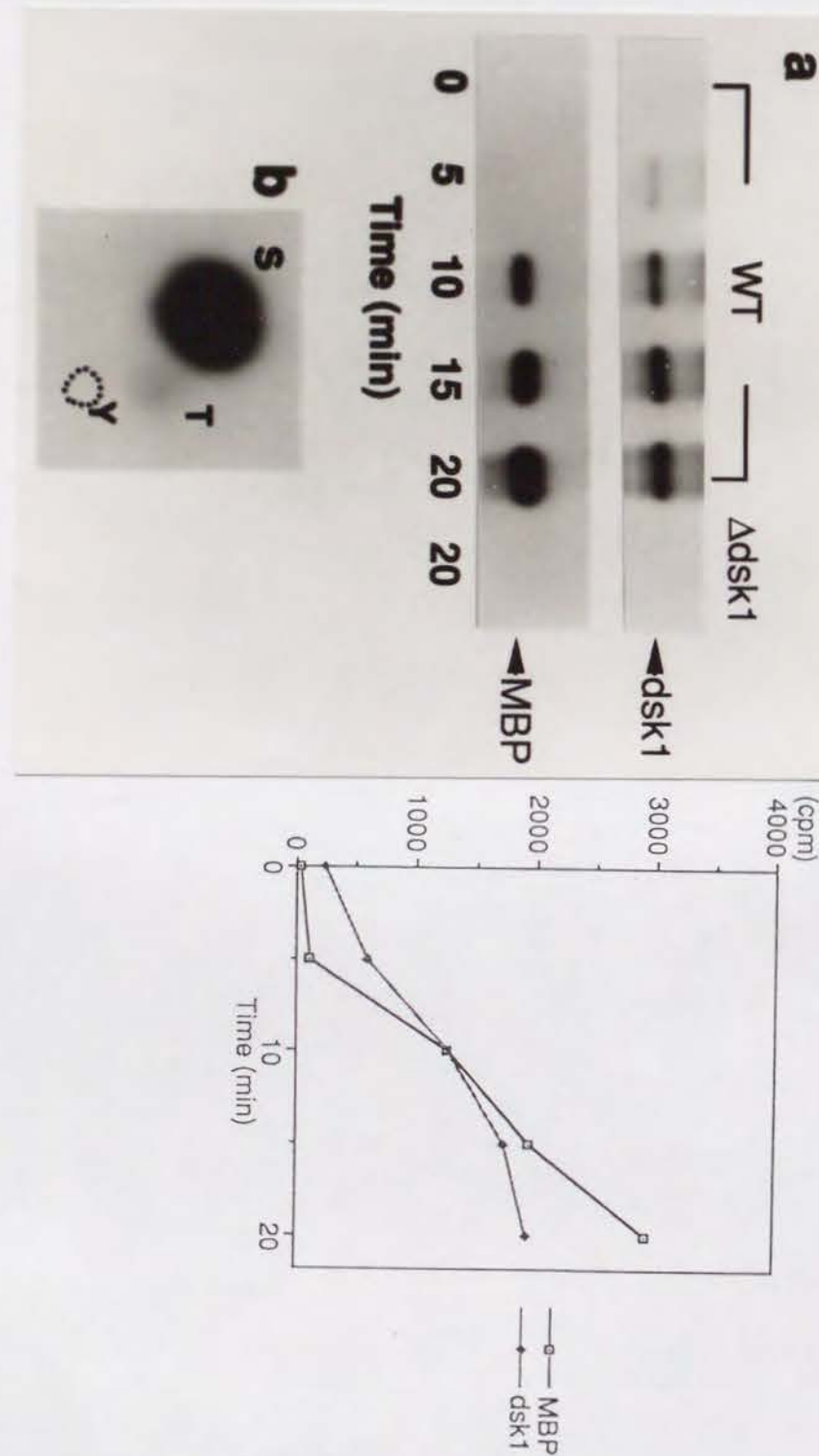


図10: dsk1によるMBPのin vitro磷酸化  
(a)野生株及びΔdsk1株からdsk1免疫複合体を調整して、ミエリン塩基性タンパク質(MBP,0.5mg/ml)、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP存在下で0-20分保温した。dsk1とMBP両方が類似した一次反応を示した(右グラフ)。Δdsk1株では磷酸化は検出されなかった(左パネル)。(b)磷酸化されたMBPを酸加水分解後、薄相クロマトグラフィーした。S,磷酸化セリン;T,磷酸化スレオニン;Y,磷酸化チロシン。



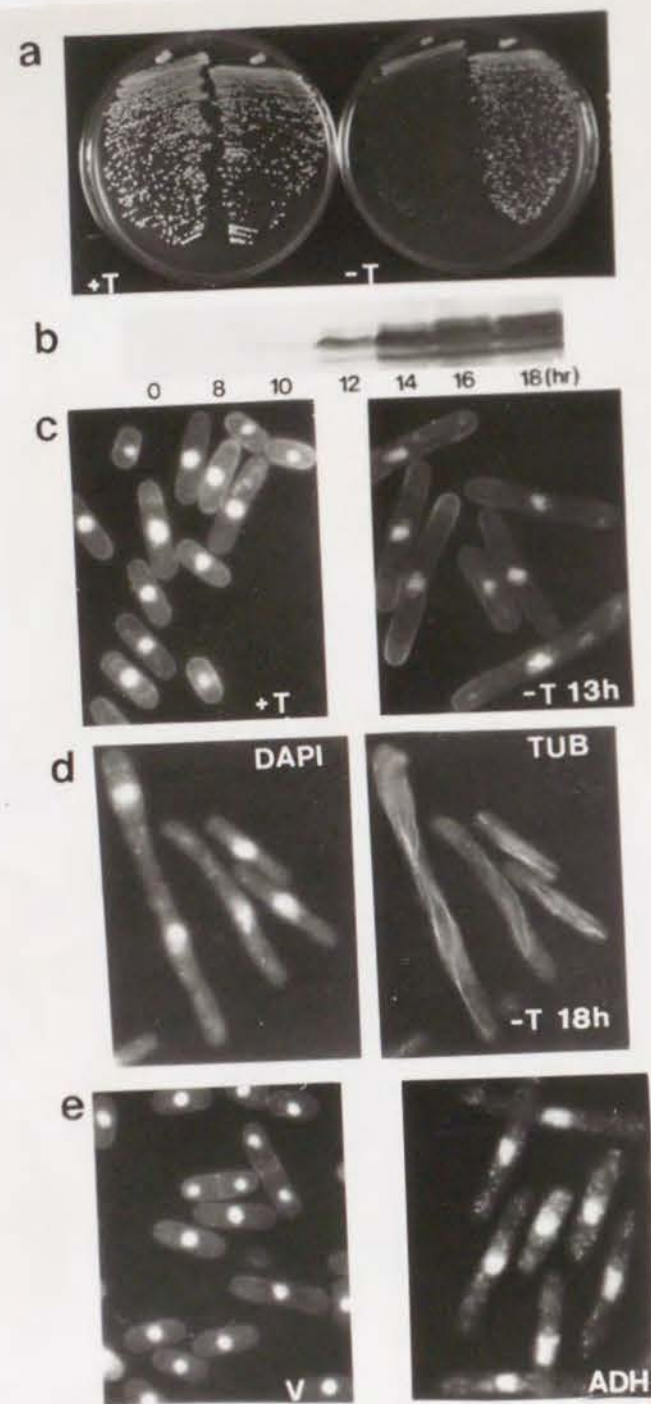


図 11 : *dsk1*<sup>+</sup>遺伝子の過剰発現による細胞周期進行の遅延  
(a)チアミンの入った(+T)あるいは入っていない(-T)EMM2培地で二種の株を植えた。各プレートはnmt1プロモーターのベクタープラスミドをもった野生株。左はnmt1プロモーターに*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子をつないだプラスミドpNMT(*dsk1*)をもった野生株。*dsk1*<sup>+</sup>遺伝子を過剰発現した細胞は33°Cで三日目に小さなコロニーを形成した。(b)プラスミドpNMT(*dsk1*)をもった野生株をチアミンの入ったEMM2で33°Cで培養後、チアミンの入っていないEMM2に移して培養を続けた。細胞を0,8,10,12,14,16,18時間で集めて、抽出液を調製して、SDS-PAGE後、抗*dsk1*抗体でイムノブロットした。(c)チアミン存在下(+T),チアミン非存在下(-T)で13時間培養した、プラスミドpNMT(*dsk1*)をもった野生株のDAPI染色。*dsk1*過剰発現した細胞は著しく伸長した。(d)チアミン非存在下で18時間培養した細胞の抗チューブリン抗体TAT-1(右パネル)、DAPI染色(左パネル)。(e)ADHベクタープラスミドを持った(左パネル)、プラスミドpADH(*dsk1*)を持った(右パネル)を持った野生株。細胞伸長が観察された。棒は10μm。19

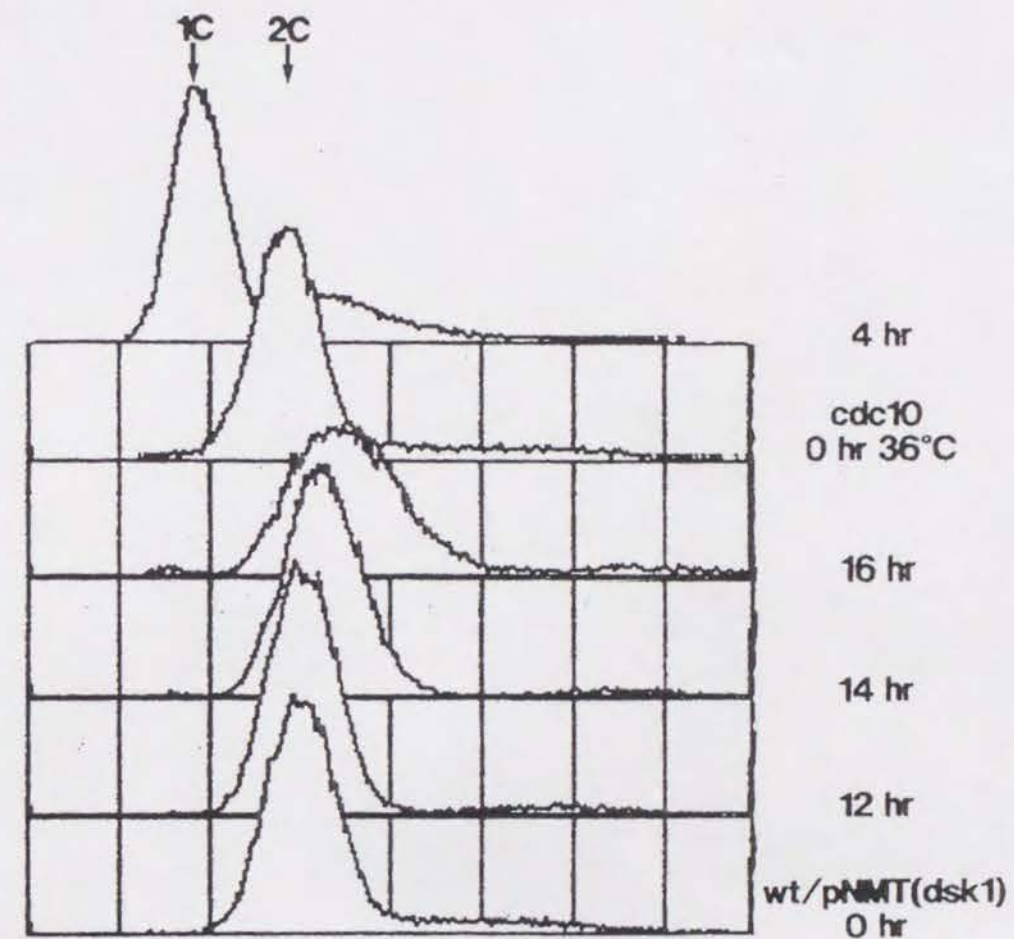


図 12 : *dsk1*過剰発現株のFACS分析  
プラスミドpNMT(*dsk1*)をもった野生株をチアミンの入っていないEMM2培地で培養した。培養開始後、12,14,16時間で細胞を集めた。ピークの位置がわずかに移動するのは細胞伸長による。G2 DNA含量の細胞が観察された。コントロールとして、*cdc10*変異株を制限温度で培養した。G1 DNA含量の細胞が4時間後に観察された。



### 分裂期停止した細胞におけるdsk1キナーゼ活性の上昇

dsk1キナーゼ活性がG2期そして分裂期停止した細胞中で変動するかどうかを調べるために、MBPを基質にしてdsk1免疫複合体のキナーゼ活性を測定した。cdc25停止(G2期停止、36°C,4時間)、nuc2停止(分裂期停止、36°C,4時間)した細胞及び同様に温度処理した野生株からそれぞれ細胞抽出液を調製した。図13,上のパネルに示されているように、野生株では二種のバンドが共存するが、cdc25停止した細胞では移動度の大きいバンドが、nuc2停止した細胞では移動度の小さいバンドが主要である。MBPの<sup>32</sup>P標識は、分裂期停止した細胞由来のdsk1が高かった。三回の独立した実験のイメージングアナライザー、フジBAS2000による定量化から分裂期停止した細胞のdsk1活性は野生株のものに比して3-7倍高いことが分かった。cdc25停止した細胞由来のdsk1のMBP磷酸化及び自己磷酸化能は野生株より高かった。これは三回の独立した実験で再現できたが、その理由は分からない。

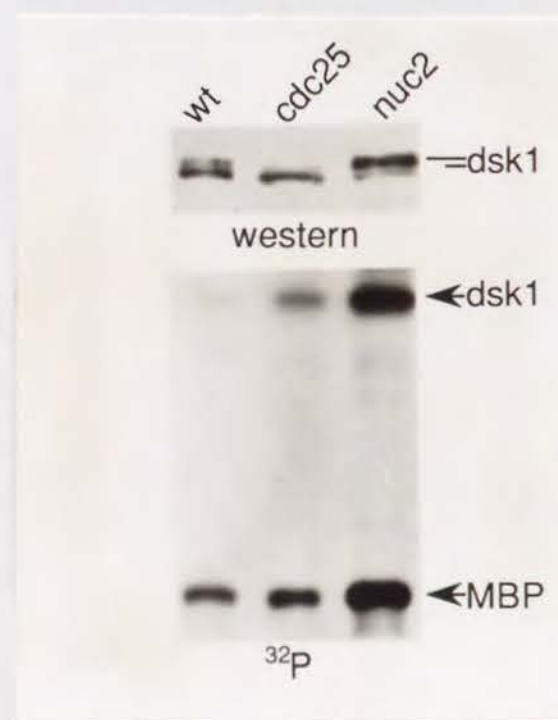


図13：野生株、G2期停止株、分裂期停止株由来のdsk1によるdsk1及びMBPの磷酸化

36°Cで4時間培養した野生株、cdc25-22変異株(G2期停止)、nuc2変異株(分裂期停止)由来のdsk1免疫複合体をMBP(0.5mg/ml)、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP存在下で25°C,15分保温して、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーした。上パネルは抗dsk1抗体によるイムノブロット。G2期停止したcdc25変異株では移動度の大きいバンドが、分裂期停止したnuc2変異株では移動度の小さなバンドが顕著であった。下パネルはdsk1およびMBPのオートラジオグラフィー。

### 野生株、G2期停止、分裂期停止した細胞でのdsk1プロテインの免疫蛍光による細胞内局在

正常な細胞周期あるいは細胞周期停止した細胞でdsk1プロテインの細胞内局在が変化するかを調べるために、アフィニティ精製した抗dsk1抗体を用いて、免疫蛍光観察を行った。シングルコピーのdsk1を発現する野生株では抗dsk1抗体による免疫蛍光は非常に弱かったので、マルチコピープラスミドpDS113-6を野生株に導入した。図14a (Wt/p(dsk1))にしめされているように、多くの細胞では細胞質の免疫蛍光が顕著であった(右パネル)。しかし、分裂期細胞(左パネルのDAPI染色像で矢印でしめされている)は、細胞質染色に加えて、核、非クロマチン領域の強い免疫蛍光をしめした。免疫前血清は同条件下で、免疫蛍光をしめさなかった。更に、dsk1欠失株( $\Delta$ dsk1)では抗dsk1抗体による免疫蛍光はほとんど検出されなかった。

次に、p(dsk1)を導入したnuc2変異株を非許容温度(36°C,4時間)で培養して、分裂期停止した細胞を用いた。図14bでしめされているように、70%以上の細胞で細胞質染色に加えて、強い核の染色が観察された。この値は分裂期停止した表現型をしめすnuc2変異株の頻度に相当した。

p(dsk1)を導入したcdc25変異株を非許容温度(36°C,4時間)で培養して、G2期停止した細胞を用いた。図14cにしめされているように、すべての細胞で細胞質の免疫蛍光が顕著であった。核染色は観察されなかった。これらの結果、dsk1の局在が少なくとも一部は細胞周期のステージに依存して変化することを示唆した。核局在は野生株の分裂期の細胞あるいは分裂期停止した細胞で観察された。

更に、核移行に参与するdsk1プロテインのドメインを同定した。種々の部位を欠失したdsk1を発現するプラスミドを作製して、dsk1欠失株( $\Delta$ dsk1)に導入した。図14dにしめされているように、dsk1キナーゼに特異的なスパーサー領域を欠いたdsk1プロテインは細胞周期を通じて核に局在した。



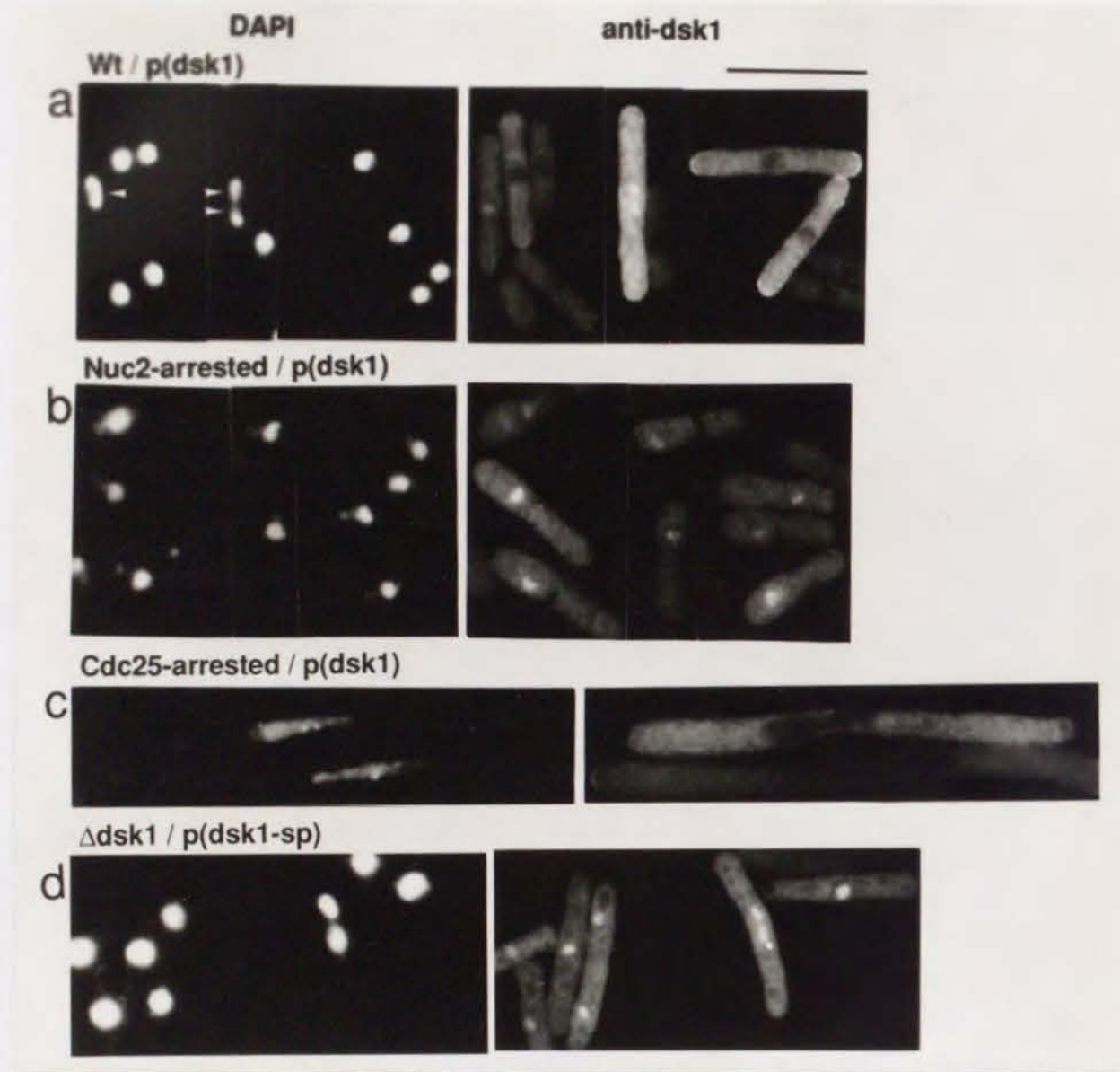


図14：アフィニティ精製抗dsk1抗体による野生株、分裂期停止株、G2期停止株におけるdsk1タンパク質の間接免疫蛍光

(a) プラスミドp(dsk1)を持った野生株をアフィニティ精製抗dsk1抗体で染色した。左パネル；DAPI染色。染色体分離過程の分裂期細胞が矢印で示されている。右パネル；同じ細胞の抗dsk1抗体染色。多くの細胞では細胞質の蛍光が主要だが、分裂期後期の細胞では細胞質に加えて核の蛍光も検出された。ベクタープラスミドをもった野生株も類似の蛍光像を示したが、そのシグナルは非常に弱かった。(b) プラスミドp(dsk1)をもったnuc2変異株を制限温度で4時間培養した。左；DAPI染色。右；抗dsk1抗体染色。ほとんどの細胞が、細胞質の染色に加えて、強い核染色を示した。(c) プラスミドp(dsk1)をもったcdc25変異株を制限温度で4時間培養した。左；DAPI染色。右；抗dsk1抗体染色。細胞質染色が顕著で、核染色は観察されなかった。(d) スペーサー領域を欠いたdsk1<sup>+</sup>遺伝子をもったΔdsk1株を33℃で培養した。細胞質染色に加えて、強い核染色が観察された。棒は10μm。

cs dis1変異とIIA型プロテインホスファターゼ(ppa2)、dsk1プロテインキナーゼの関係  
cs dis1変異はppa2<sup>+</sup>遺伝子欠失(Δppa2)によって相補される

dis変異株の類似した表現型から、dis1変異もdis2 (I型プロテインホスファターゼ)やdis3 (出芽酵母SIT4プロテインホスファターゼ関連因子SSD1ホモログ)と同様にプロテインホスファターゼ機能に関連するかもしれない。そこで、cs dis1-288変異株と種々のプロテインホスファターゼ変異株で二重変異株を作成した(表2)。

dis1変異とdis2, dis3変異との二重変異株が致死になることは、これらdis<sup>+</sup>遺伝子産物の機能的類似性を示唆するものと考えられる。Δsds21/dis1-288二重変異株が生育可であることは、sds21<sup>+</sup>遺伝子産物が低活性のI型プロテインホスファターゼであることで説明される。

驚いたことに、cs dis1変異はIIA型プロテインホスファターゼの主要な活性を担うppa2+遺伝子の欠失(Δppa2)によって相補されることがわかった(表2)。しかし、低活性のIIA型プロテインホスファターゼppa1<sup>+</sup>遺伝子の欠失(Δppa1)によっては相補されない。Δppa2/dis1-288二重変異株の細胞長は低温(20℃)ですらΔppa2変異株と類似して、野生株より短い(図15)。更に、cs Δdis1変異(黒岡 修論)もΔppa2変異によって部分的に相補される。この現象の原因として、I. dis1変異がIIA型プロテインホスファターゼの活性異常を引き起こし、従って、主要な活性を担うppa2+遺伝子の欠失によってその影響を和らげること、あるいは、II. IIA型プロテインホスファターゼの活性と拮抗する反応がcs dis1変異では抑さえられていることが考えられる。

Δsds21/dis1-288	生育可、cs
Δdis2/dis1-288	発芽するがコロニー形成不可
dis2-11/dis1-288	発芽不可
wee1-6/dis1-288	生育可、cs
cdc2-1w/dis1-288	生育可、cs
cdc2-3w/dis1-288	生育可、cs
dis3-54/dis1-288	発芽可、数回分裂可 コロニー形成不可
Δppa1/dis1-288	生育可、cs
Δppa2/dis1-288	生育可、cs <sup>+</sup>
Δppa1/dis2-11	生育可、cs
Δppa2/dis2-11	生育可、cs
Δppa1/dis3-54	生育可、cs
Δppa2/dis3-54	生育可、cs

表2：dis1変異株と種々のプロテインホスファターゼ変異株との二重変異株

cs dis1-288変異株と種々のプロテインホスファターゼ関連変異株の交配は、まず30℃で接合させて、33℃、YPD培地上で四分子解析した。wee1-6,cdc2-1w,cdc2-3w(Nurse and Thuriaux, 1980)との交配は、まず26℃で接合させて、33℃、YPD培地上で、四分子解析した。cs(低温感受性)は22℃、YPD培地上での生育。



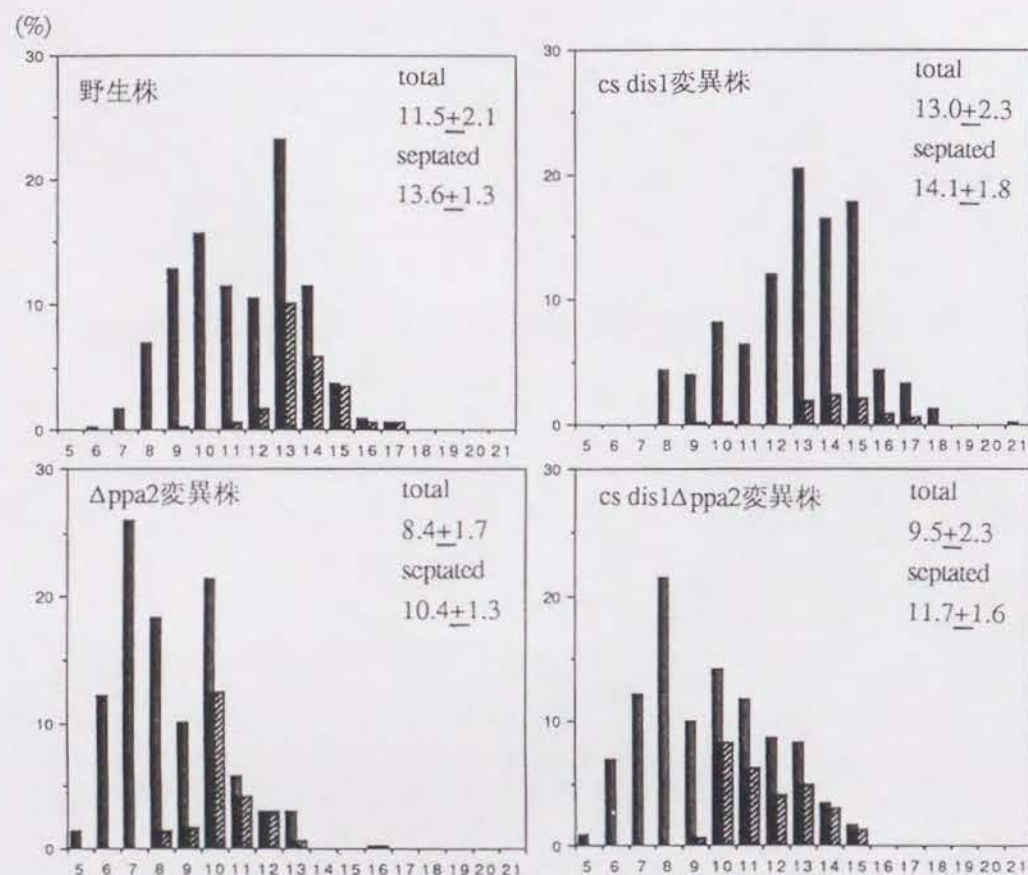


図15: 野生株、cs dis1変異株、Δppa2変異株、cs dis1Δppa2二重変異株の細胞長分布

野生株、cs dis1変異株、Δppa2変異株、cs dis1Δppa2二重変異株をYPD培地で20°C, 12時間培養した。250以上の細胞を測った。斜線の入った棒は隔壁を持った細胞。平均長はμmでしめされている。

IIA型プロテインホスファターゼ(ppa2)とdsk1プロテインキナーゼはcs dis1変異に拮抗的に働く

Δppa2変異株は、cdc2プロテインキナーゼの活性を抑えて分裂期への進行を阻害するwee1プロテインキナーゼの変異株に類似した短い細胞長を示す(Russell and Nurse, 1987; Kinoshita et al., 1990)。また、Δppa2変異は分裂期への進行を正に制御するcdc2プロテインキナーゼ特異的なcdc25プロテインチロシンホスファターゼの高温感受性変異株を部分的に相補する(Kinoshita et al., 準備中)ことから、Δppa2変異では分裂期へ移行するタイミングが野生株より早いと考えられる。しかし、表2に示されているようにcs dis1-288変異はwee1変異によって相補されなかった。cs dis1-288変異がΔppa2変異によって相補されるのは、cdc2プロテインキナーゼ活性の制御を通してではない。

cs dis1変異のマルチコピーサプレッサーであるdsk1プロテインキナーゼと、その欠失によってcs dis1変異を相補するppa2 IIA型プロテインホスファターゼは拮抗的に作用すると考えられる。その拮抗性が相互依存的であるかどうかをしらべるためにcs dis1、Δppa2、Δdsk1変異による多重変異株を作成した(図16)。Δppa2Δdsk1二重変異株はΔppa2変異株に類似した表現型をしめした。cs dis1Δdsk1二重変異株はCSでcs dis1と類似した表現型を示した。前述したように、cs dis1変異はΔppa2変異によって相補されるが、cs dis1Δdsk1Δppa2三重変異株はCSでdis表現型をしめした(図17)。すなわち、Δppa2はcs dis1Δdsk1二重変異を相補できなかった。これはΔppa2のcs dis1変異に対する相補性がdsk1プロテインキナーゼ活性に依存することを示唆した。



	22°C	33°C
1:wild type	+	+
2:cs dis1	-	+
3:Δppa2	+	+
4:Δdsk1	+	+
5:Δppa2Δdsk1	+	+
6:cs dis1Δppa2	+	+
7:cs dis1Δdsk1	-	+
8:cs dis1Δppa2Δdsk1	-	+

図16: Δppa2変異はcs dis1Δdsk1二重変異を相補できない  
YPDプレートに植えて、33°C, 3日間あるいは22°C, 4日間保温した。



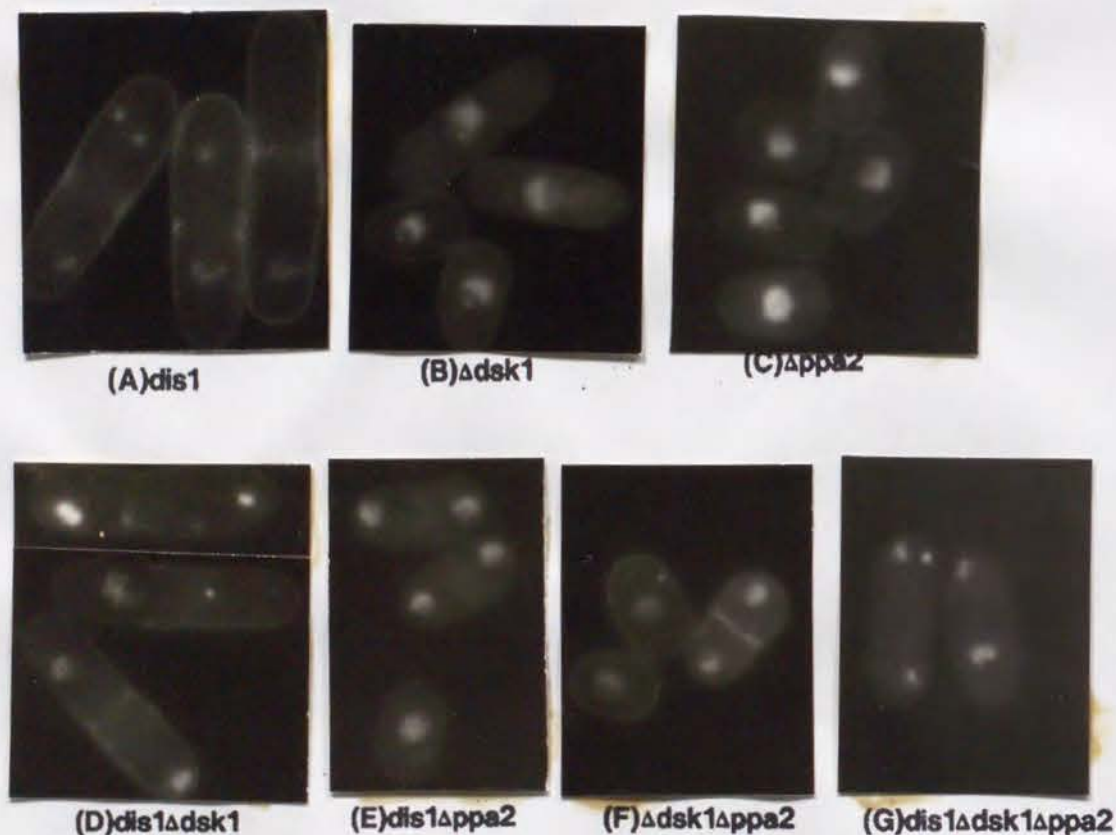


図17: DAPI染色

(A) *csdis1*変異株、(B)  $\Delta$ *ppa2*変異株、(C)  $\Delta$ *dsk1*変異株、(D) *csdis1* $\Delta$ *ppa2*二重変異株、(E) *csdis1* $\Delta$ *dsk1*二重変異株、(F)  $\Delta$ *ppa2* $\Delta$ *dsk1*二重変異株、(G) *csdis1* $\Delta$ *ppa2* $\Delta$ *dsk1*三重変異株をYPD培地で20℃、12時間培養した。*csdis1* $\Delta$ *ppa2* $\Delta$ *dsk1*三重変異株は短い細胞長で、*dis1*に類似した染色体像を示す。

## 考察

分裂酵母*dsk1*プロテインキナーゼは二重特異性プロテインキナーゼ(dual specific protein kinase)である

分裂酵母*dsk1*遺伝子は544アミノ酸からなるプロテインキナーゼをコードをする。キナーゼ触媒ドメインは436アミノ酸(81-516)からなり出芽酵母CDC7キナーゼ(437アミノ酸, Patterson et al., 1986)につぐ大きなものである。分裂酵母*dsk1*免疫複合体及び大腸菌で作成した*bdsk1*はin vitroでミエリン塩基性タンパク質(MBP)のセリンを強く、そしてスレオニンを弱くリン酸化する。MBPはMitogen-activated protein (MAP)キナーゼ(reviewed in Pelech and Sanghera, 1992)のin vitroでの良い基質であり、in vivoでのリン酸化部位と同じ97番目のスレオニンが主にリン酸化される(Erickson et al., 1990)。このことは、*dsk1*キナーゼとMAPキナーゼのリン酸化様式が異なることを意味する。分裂酵母*dsk1*免疫複合体及び*bdsk1*はin vitro自己リン酸化によってセリン、スレオニン、チロシンをリン酸化する。*dsk1*キナーゼは三種の水酸化アミノ酸(セリン、スレオニン、チロシン)をリン酸化する新しいタイプの二重特異性プロテインキナーゼ(dual specific protein kinase)(Lindberg et al., 1992)に分類されるのかも知れない。*dsk1*キナーゼと高いホモロジーをしめす既知のプロテインキナーゼはない。しかしながら、*dsk1*キナーゼと27%(331アミノ酸中)のホモロジーをしめす二重特異性プロテインキナーゼであるマウスCLK/STY(Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991)は*dsk1*と類似した二つのモチーフを持つ(図3); 1. *dsk1*キナーゼはキナーゼ触媒ドメインVIとVIIの間に125アミノ酸のスペーサーを持つ。既知のプロテインキナーゼにはこの位置に長いスペーサーを持つ例は報告されていないが、唯一、マウスCLK/STYキナーゼは19アミノ酸の挿入配列を持つ。2. キナーゼ触媒ドメインVIb中、HTDLKPENが共通している。この配列中で殆どのセリン/スレオニンプロテインキナーゼで保存されている2番目のR(Hanks et al., 1989 and 1991)がTで置換されている。

*dsk1*プロテインキナーゼを含め、三種の水酸化アミノ酸をリン酸化する二重特異性プロテインキナーゼの構造的特徴は明かではない(Lindberg et al., 1992)。チロシン芳香環の疎水性及びセリン/スレオニンとチロシンにおける水酸基のペプチド骨格からの距離の違いを考慮すると二重特異性がシングルの活性部位によるとは考えにくい。既に報告されている幾つかの二重特異性プロテインキナーゼと*dsk1*との比較から、以下の二つの特徴のいずれかを満たすことが条件になるかもしれない(図18,19)。1. キナーゼ触媒ドメインVIIIのRxYRapE (x:任意のアミノ酸、a,p:たいていはアラニン、プロリン)。2. キナーゼ触媒ドメインVIbのhrDIKpeN (h,r,l,p,e:たいていはそれぞれ、ヒスチジン、アルギニン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸)配列中、2番目の残基あるいは7番目の残基が中性アミノ酸であること。cAMP依存性プロテインキナーゼの結晶解析(Knighton et al., 1991)は、1.のキナーゼ触媒ドメインVIIIの配列が分子表面で基質結合に関与することをしめした。また、2.のキナーゼ触媒ドメインVIbは活性中心ループを形成し、殊に3番目のD、最後のNはリン酸基転移反応に直接関与する残基であることを示した。これらのアミノ酸



残基の置換は典型的なセリン/スレオニンプロテインキナーゼとチロシンプロテインキナーゼより柔軟構造の活性中心を形成し、両タイプの水酸基に対応できるのかもしれない。二重特異性プロテインキナーゼの生理的意義は、動物では、MAPキナーゼ/MAPキナーゼキナーゼ(Alessandrini et al., 1992; Kosaka et al., 1992; Rossomando et al., 1992)で、酵母ではFUS3, KSS1/STE7, spk1+/byr1+(Cairns et al., 1992; Crews et al., 1992; Gartner et al., 1992; Stevenson et al., 1992)のシグナル伝達系で実証された。これまでに、自己リン酸化以外はdsk1による基質を用いたin vitro反応でチロシンリン酸化は検出できていないので、まだ同定されていない基質がチロシンリン酸化されるかどうかを明らかにしなければならない。更に、重要なことはin vivoの基質を同定することで、dsk1のin vitroでの二重特異性(dual specificity)が生理的に重要かどうかが明らかになる。

cAPKa	YRDLKPEN	PEYLAPE
pskcon	hrDxKxxN	xxxxxpe
dsk1	<b>H</b> TDLKPEN	<b>RQYRSPE</b>
weel	<b>H</b> LDLKP <b>A</b> N	CEYIAPE
mik1	<b>H</b> LDVKP <b>S</b> N	RVYIAPE
CLK	<b>H</b> TDLKPEN	<b>RHYRAPE</b>
ERK1	HRDLKP <b>S</b> N	<b>RWYRAPE</b>
ERK2	HRDLKP <b>S</b> N	<b>RWYRAPE</b>
KSS1	HRDIKP <b>S</b> N	<b>RWYRAPE</b>
byr1	HRDLKP <b>S</b> N	STYMSPE
STE7	HRDLKP <b>S</b> N	STYMSPE
MCK1	HRDIKP <b>S</b> N	<b>RFYRAPE</b>
DPYK1	HRDLSSRN	IPYMAPE
DPYK2	HRDLTSQN	PRWRPPE
ptkcon	HRdlaarN	xxwxape
キナーゼ触媒 ドメイン	Vib	VIII

図18：二重特異性プロテインキナーゼの比較

注：白抜き文字は12個のプロテインキナーゼで保存されている残基。太文字は二重特異性プロテインキナーゼの条件と思われる置換。pskcon, ptkconはそれぞれプロテインセリン/スレオニンキナーゼ、プロテインチロシンキナーゼのコンセンサス配列。大文字は完全に保存されている残基。小文字はほぼ保存されている残基。典型的なプロテインセリン/スレオニンキナーゼの例としてヒトcAMP依存性プロテインキナーゼcAPKa (Maldonado and Hanks, 1988)を挙げた。weel (Featherstone and Russell, 1991), mik1 (Lundgren et al., 1991), CLK (Ben-David et al., 1991; Howell et al., 1991), ERK1, ERK2 (Seeger et al., 1991), KSS1 (Gartner et al., 1992), byr1 (Crews et al., 1992), STE7 (Cairns et al., 1992), MCK1 (Dailey et al., 1990), DPYK1, DPYK2 (Tan and Spudich, 1990). DPYK1, DPYK2は他の配列と異なり、プロテインセリン/スレオニンキナーゼとプロテインチロシンキナーゼのモザイク構造である。

生物種	自己リン酸化	リン酸化チロシン基質	大腸菌で発現させたもの 抗リン酸化チロシン抗体
dsk1 分裂酵母	PY=PS	NT	+
weel 分裂酵母	PY=PS	cdc2, アノジオチンシンII	NT
mik1 分裂酵母	NT	NT	NT
CLK ヱウス	PY=PS	poly(Glu/Tyr)	+
ERK1 ヒト	PY=PT	NT	+
ERK2 ヒト	PY=PT	NT	+
MCK1 出芽酵母	PY=PS	poly(Glu/Tyr)	+
DPYK1 粘菌	PY?	NT	+
DPYK2 粘菌	PY?	NT	+

図19：二重特異性プロテインキナーゼの特徴

注：in vitro自己リン酸化でリン酸化チロシン標識がリン酸化セリン、リン酸化スレオニン標識に比べて極めて弱いものはこのグループに入れていない。NT, not tested.



## dsk1蛋白質の制御された磷酸化

dsk1蛋白質は、SDS-PAGE上で二種の移動度の近接したバンドとして検出され、それらの量比がG2期あるいは分裂期停止した細胞では著しく異なる。移動度の大きいバンド(分子量61 Kd)はG2期停止したcdc2あるいはcdc25変異株の他、G1期停止、S期停止した変異株すなわち間期停止した状態で増大するが、移動度の小さいバンド(分子量63 Kd)は分裂期停止したdis1,nda3,nuc2変異株で増大する。これら二つの近接したバンドが磷酸化状態の違いによることの証拠を示した。酸ホスファターゼ(PAP)処理後、移動度の小さいバンドは消失する。更に、in vivo  $^{32}\text{P}$ 標識した分裂酵母細胞から調製したdsk1免疫複合体が標識される。このことはdsk1が磷酸化タンパク質であることを示す。標識の程度は分裂期停止した細胞で増大するので、少なくとも、移動度の小さいdsk1バンドは磷酸化型であり、バンドシフトは磷酸化/脱磷酸化によると考えられる。磷酸化アミノ酸分析から磷酸化セリンが主要で、弱いスレオニンの磷酸化も認められた。予備的実験から、dsk1プロテインのin vivo磷酸化部位は複数あり、C末側に主要な部位があるかも知れない(図20)。セリン、スレオニン、プロリン残基に富むスペーサー領域(図3)がin vivo磷酸化されているかはわからない。スペーサー領域にはMAPキナーゼによる磷酸化コンセンサス配列(PxS/TP;xは塩基性あるいは中性、Clark-Lewis et al., 1991)が一つある。cdc2プロテインキナーゼによる磷酸化コンセンサス配列(S/TPxz;xはしばしば極性残基、zは塩基性)はない。分裂酵母cdc2プロテインキナーゼの167番目のスレオニン残基(Solomon et al., 1992)、マウス、アフリカツメガエルp42MAPキナーゼのそれぞれ183番目、188番目のスレオニン残基(Payne et al., 1991; Posada et al., 1992)のin vivo磷酸化は、キナーゼ活性自体に必須である。dsk1の372番目のスレオニン残基はこれらの残基に相当する位置にあるので、dsk1のin vivo磷酸化部位である可能性が高い(図21)。スペーサーを欠失したdsk1プロテインはシングルバンドとして検出されるので(図22、レーン5)、スペーサー領域のコンフォメーションもSDS-PAGE上のバンドシフトに寄与しているのかもしれない。dsk1のin vitro自己磷酸化では検出された磷酸化チロシンはin vivoでは検出されなかった。この原因は明かではないが、例えば、in vivoでは基質がdsk1に近接しているために、チロシン残基に対する自己磷酸化が抑圧されているのかもしれない。図22に示すように、スペーサーを欠いたdsk1の自己磷酸化標識は完全なdsk1の25%位であった。予備的実験から、これら二種のdsk1プロテインのMBPを磷酸化する触媒活性自体はほぼ同じレベルであることから、dsk1のin vitro自己磷酸化の主要な部位はスペーサー領域にあるかもしれない。1mM ATP, 25mM  $\text{MgCl}_2$ 存在下、一時間以上の保温ですら(Haystead et al., 1992)、in vitro自己磷酸化のみではバンドシフトは検出できなかった。

dsk1のin vivoでの自己磷酸化の調節の可能性を含めて、dsk1の磷酸化を担うセリン/スレオニンプロテインキナーゼあるいはホスファターゼが存在すると思われる。

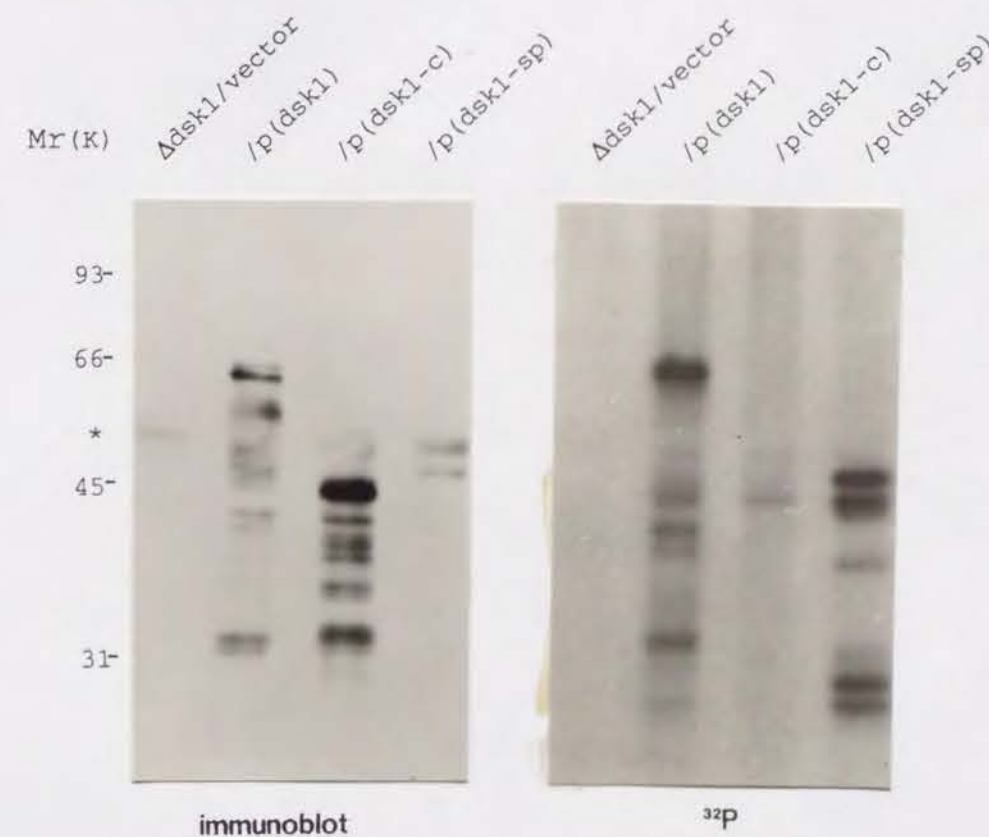


図20: dsk1変異タンパク質の磷酸標識

Δdsk1株(レーン1)、完全なdsk1遺伝子を含むプラスミドpDS113-6(p(dsk1))をもったΔdsk1株(レーン2)、C末端側を欠失したdsk1遺伝子を含むプラスミドpDS113-8(p(dsk1-c), 40 Kd)を持ったΔdsk1株(レーン3)、スペーサー領域を欠失したdsk1遺伝子を含むプラスミドpDS113-9(p(dsk1-sp), 48 Kd)を持ったΔdsk1株(レーン4)を $^{32}\text{P}$ 無機磷酸を含んだEMM1培地で培養した。 $^{32}\text{P}$ 標識した細胞抽出液を調整後、抗dsk1抗体で免疫沈殿、SDS-PAGE、抗dsk1抗体でイムノブロット(左パネル)、オートラジオグラフィーした(右パネル)。\*は免疫グロブリン重鎖。C末端側を欠失したdsk1タンパク質はほとんど磷酸化されていなかった(レーン3)。スペーサー領域を欠いたdsk1タンパク質も磷酸化されていた。各レーンで分子量の小さいものは分解産物。



dsk1	<b>T</b> NDVQTRQYRSP <b>E</b>
KSS1	<b>T</b> E <b>Y</b> VATRWRAP <b>E</b>
cdc2Sp	<b>T</b> HEIVTLWYRAP <b>E</b>
CDC28	<b>T</b> HEIVTLWYRAP <b>E</b>
cdc2HS	<b>T</b> HEVVTIWYRSP <b>E</b>
ERK1	<b>T</b> E <b>Y</b> VATRWRAP <b>E</b>

図 2 1 : キナーゼ活性に必須な磷酸化を受けるスレオニン残基

注：太文字はキナーゼ活性に必須な磷酸化を受ける残基。相当するdsk1のスレオニン残基を囲んだ。KSS1,ERK1ではチロシン残基の磷酸化も必須。分裂酵母cdc2 (cdc2Sp,Hindley and Phear, 1984) 出芽酵母CDC28 (Lorincz and Reed, 1984) ヒトcdc2 (cdc2Hs,Lee and Nurse, 1987)

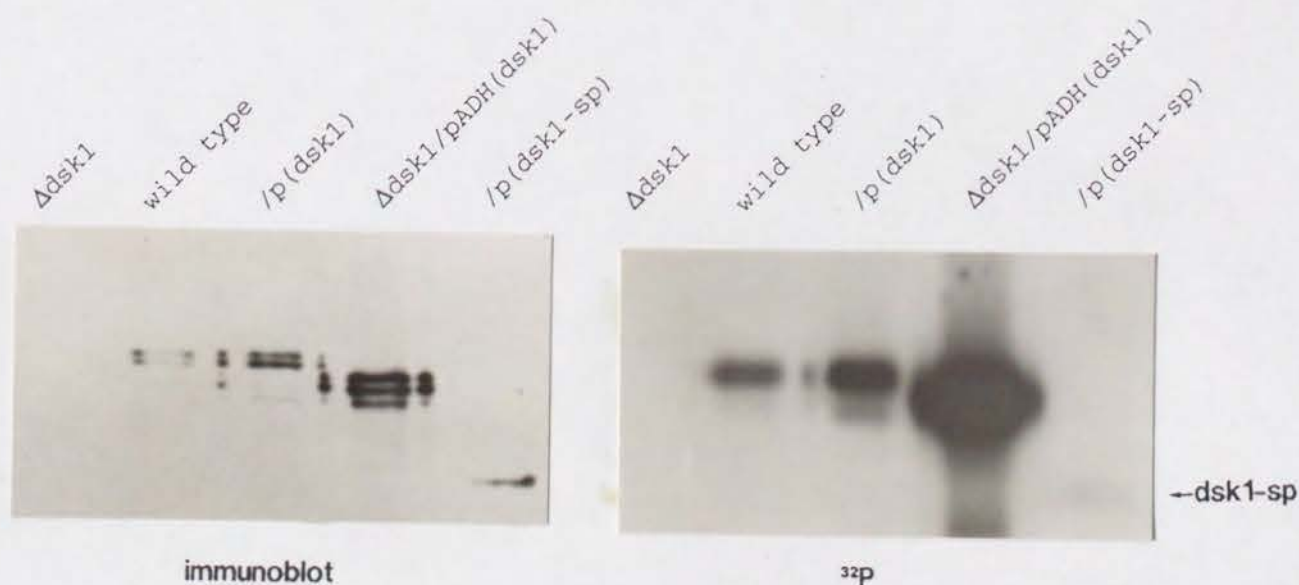


図 2 2 : dsk1のin vitro自己磷酸化能の比較

Δdsk1株(レーン 1)、野生株(レーン 2)、完全なdsk1<sup>+</sup>遺伝子を含むプラスミドpDS113-6をもった野生株(レーン 3)、dsk1を過剰発現するプラスミドpADH(dsk1)をもったΔdsk1株(レーン 4)、スパーサー領域を欠失したdsk1<sup>+</sup>遺伝子を含むプラスミドpDS113-9をもったΔdsk1株(レーン 5)からdsk1免疫複合体を調整して、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP存在下で保温した。左パネルは抗dsk1抗体によるイムノブロット、右パネルはオートラジオグラフィ。スパーサーを欠いたdsk1タンパク質の標識(レーン 5)は、完全なdsk1タンパク質の標識(レーン 2)の25%であった。



dsk1<sup>+</sup>遺伝子は生育に必須ではない。

dsk1遺伝子破壊株 $\Delta$ dsk1は最小培地で野生株より若干遅いながら生育するので(1世代時間  $\Delta$ dsk1 3時間 野生株 2.5時間)、dsk1<sup>+</sup>遺伝子は生育に必須ではない。また、dsk1<sup>+</sup>遺伝子破壊株のホモ接合型は接合及び胞子形成に異常はない。また、微小管重合阻害剤TBZ、DNA合成阻害剤ヒドロキシウレア、カフェインに対する感受性は野生株と同じであった(表3)。dsk1<sup>+</sup>遺伝子はもともとcs dis1変異を相補するマルチコピーサプレッサーとして単離されたので、その過剰発現が分裂期から間期への移行を促進すると考えられる(図23)。dis1変異はスピンドルの形成及び伸長はおこるが染色体分離が阻害されている表現型を示す(Ohkura et al.,1988)。分裂期から脱出できないことは非許容温度においてcs dis1変異株はcdc2キナーゼが活性化され、その活性が高いままであることと一致する(Kinoshita et al.,1991)。dis1<sup>+</sup>遺伝子はクローンされたが、その予想されるアミノ酸はタンパク質キナーゼ、タンパク質ホスファターゼとホモロジーを示さない(Kurooka et al.,準備中)。dis1タンパク質が磷酸化されているかどうか、その磷酸化がdsk1によって制御されているかどうかは今後の研究対象となるだろう。cs dis1 $\Delta$ dsk1二重変異株は許容温度で生育できること、マルチコピー-dsk1<sup>+</sup>がdis1<sup>+</sup>遺伝子の欠失変異(cs  $\Delta$ dis1)を相補することから、dis1<sup>+</sup>遺伝子とdsk1<sup>+</sup>遺伝子はその必須機能を重複しておらず、dsk1はcs dis1変異をバイパスするとおもわれる。dsk1キナーゼと機能を重複するものが在るかどうかはあきらかではないが、dsk1キナーゼの機能を知るうえで、synthetic lethal になる変異遺伝子のスクリーニングが重要であろう。

	TBZ				
	0	5	10	15	20 ( $\mu$ g/ml)
wt (HM123)	++	++	++	++	++
$\Delta$ dsk1	++	++	++	++	++
dis1-288	++	++	++	++	+
dis1-288 $\Delta$ dsk1	++	++	++	++	+

	HU				
	0	2.5	5	7.5	10 (mM)
wt (HM123)	++	++	+	$\pm$	$\pm$
$\Delta$ dsk1	++	++	+	$\pm$	$\pm$
dis1-288	++	++	-	-	-
dis1-288 $\Delta$ dsk1	++	++	-	-	-

	Caffeine			
	0	5	7.5	10 (mM)
wt (HM123)	++	++	++	+
$\Delta$ dsk1	++	++	++	+
dis1-288	++	+	$\pm$	-
dis1-288 $\Delta$ dsk1	++	+	$\pm$	-

表3： $\Delta$ dsk1変異株のTBZ、ヒドロキシウレア、カフェイン感受性は正常  
チューブリン重合阻害剤TBZ(チアベンダゾール)、DNA合成阻害剤HU(ヒドロキシウレア)、カフェインを含むYPD培地に植えて、33℃、4日間保温した。

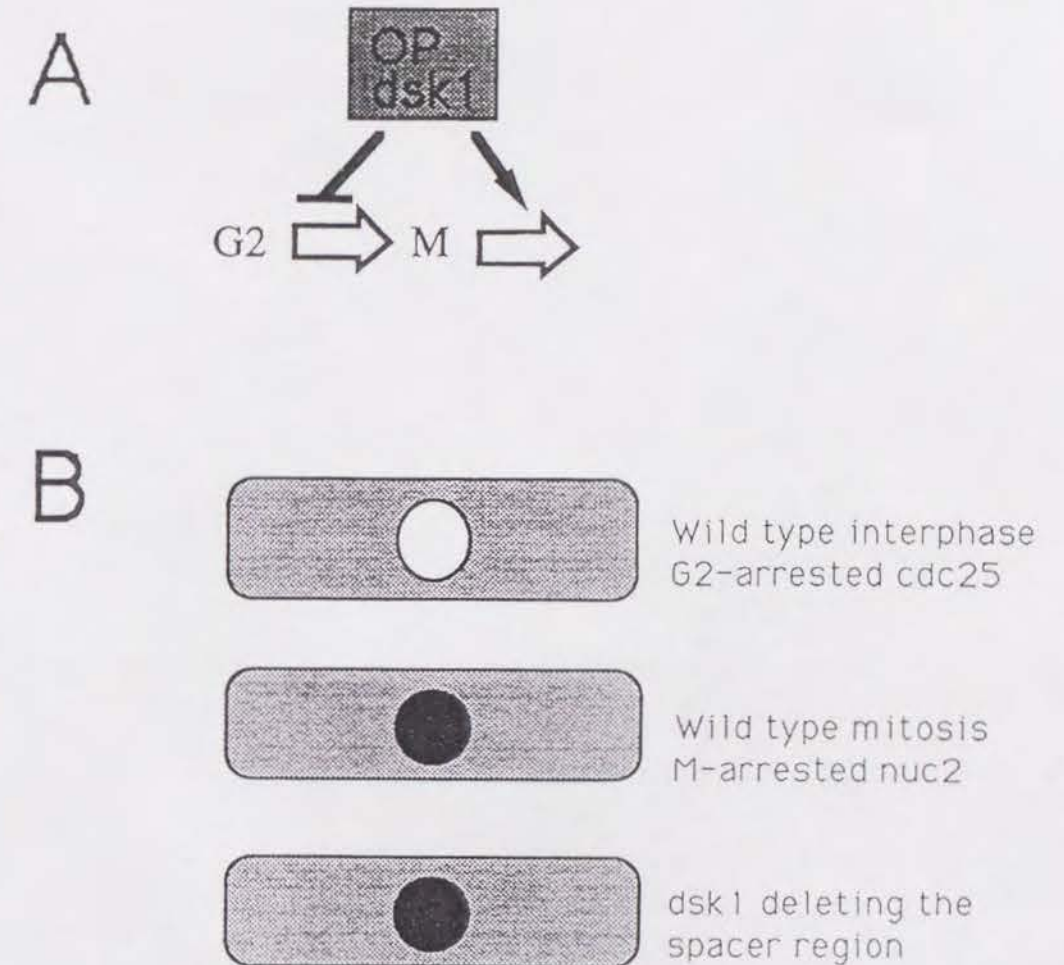


図23：dsk1プロテインキナーゼの分裂周期における役割  
A;過剰発現のdsk1プロテインキナーゼはG2期から分裂期への進行を阻害し、分裂期から間期への進行を促す。  
B;野生株の間期及びG2期停止したcdc25変異株では、dsk1タンパク質は細胞質に多い。野生株の分裂期及び分裂期停止したnuc2変異株では、dsk1タンパク質は細胞質にも核にも存在する。スペーサー領域を欠いたdsk1タンパク質は細胞周期を通じて細胞質と核に存在する。



## dsk1<sup>+</sup>過剰発現の影響と細胞内局在の関係

nmt1<sup>+</sup>遺伝子の誘導プロモーターによるdsk1<sup>+</sup>の過剰発現は、細胞生育に有害であった。dsk1を過剰発現している細胞はG2期様の細胞質微小管をもって、G2 DNA含量の一核で、顕著に伸長した。dsk1を過剰発現している細胞は小さなコロニーを形成した。また、誘導発現後16時間以降で核分裂が観察された。この結果は、過剰発現したdsk1キナーゼは、G2期から分裂期への進行を遅延させることを示唆した(図23)。ADHプロモーターからのNMTプロモーターより緩和な過剰発現はG2 DNA含量の一核を持った細胞伸長をおこすが、cs dis1変異を相補した。ADHあるいはNMT1プロモーターによるdsk1の過剰発現はwee1-50cdc25-22に対するbws活性(Booher et al., 1989)、cdc2-3wee1-50のmitotic catastrophe(Russell and Nurse, 1987)を相補する活性はないことから、その影響はcdc2プロテインキナーゼを通したのではないであろう。マルチコピーdsk1がcs dis1変異を相補することと合わせて、dsk1キナーゼの機能を推察した；多量のdsk1キナーゼは、細胞が分裂期にあるときは、間期への移行を促進して、細胞がG2期にあるときは分裂期への進行を阻害するのではないだろうか。dsk1キナーゼの細胞内局在すなわち、dsk1キナーゼが分裂期停止した細胞及び野生株の分裂期細胞で細胞質に加えて核内にも存在するが、そのほかの細胞周期ステージでは細胞質に存在することから(図23)、dsk1キナーゼの本来の機能は核内で分裂期の完了を補佐する方向で働くのではないか。非常な過剰発現した状態では、細胞質にあるdsk1キナーの全活性が高すぎて、細胞が分裂期へ進行するのを阻害するのかもしれない。しかし、より緩和な発現状態ではcs dis1変異における分裂期欠陥が相補される。dsk1キナーゼは分裂期のレギュレーターであるかもしれない。すなわち、分裂期の開始、完了が損なわれるとdsk1キナーゼが分裂期の進行を調整するのかもしれない。

```
YAK1  DILGQGTFGQVVKCQN-LLTKEILAVK
      * * * * *
dsk1  RKLGWGHFSTVWLAYD-RAAKRRVALK
      * * * * *
CLK   DTLGEGAFGKVVECIDHKVGGRRVAVK
```

### グリシンループ

図24：グリシンループを挟んだ二相性NLSの候補

注：太文字は塩基性アミノ酸。\*はdsk1と共通アミノ酸。最後のリジン残基はATP結合部位。

dsk1キナーゼの核局在と磷酸化状態の関係が示唆された。どのようにしてdsk1プロテインが核内に移行するのかは明かではない。核移行シグナル(NLS)を持ったプロテインがdsk1の磷酸化型と会合するのかもしれない。正常な細胞周期の間期と分裂期で、dsk1のバンドパターンに微小な変化を検出したが、移動度の小さいバンドが間期と分裂期において、複合体形成能を含め同一のものかどうかを調べる必要がある。また、dsk1自体がNLSを持っていて、磷酸化型が核へ移行できるのかもしれない。NLSはSV40 T抗原に代表される塩基性アミノ酸のクラスター、PKKKRKVのような単純なもの(Dingwall and Laskey, 1986)、二相性、すなわち、二つの塩基性アミノ酸のあとに約10アミノ酸が続き、更に5アミノ酸中少なくとも3アミノ酸が塩基性な配列が続くものがある(Robbins et al., 1991)。dsk1プロテインにはグリシンループ(ATP結合部位)を挟んだ二相性のNLSに相当する配列がある(図24)。この配列はホモロジーをしめすYAK1,CLKキナーゼにはない。cAMP依存性プロテインキナーゼの結晶解析(Knighton et al., 1991)を参考にすると、この領域は分子表面に露出するかもしれない(図25)。さらに、スパーサー領域も分子表面に露出するかもしれないので、上のNLSに相当する配列を覆う様に配置するかもしれない。dsk1キナーゼに特異的なスパーサーが磷酸化されることでdsk1の核移行が促されることも考えられる。これは、スパーサーを欠失したdsk1プロテインが細胞周期を通じて核に存在することを説明する。スパーサーを欠失したdsk1のマルチコピーは完全なdsk1のマルチコピーと同様にcs dis1変異を相補する(図1)。また、その過剰発現(ADHあるいはNMT1プロモーター)は細胞伸長を引き起こすが、その影響は完全なdsk1に比して弱い。このことは、dsk1プロテインの過剰発現による影響は細胞質での事象が原因であることを示唆するものと思われる。



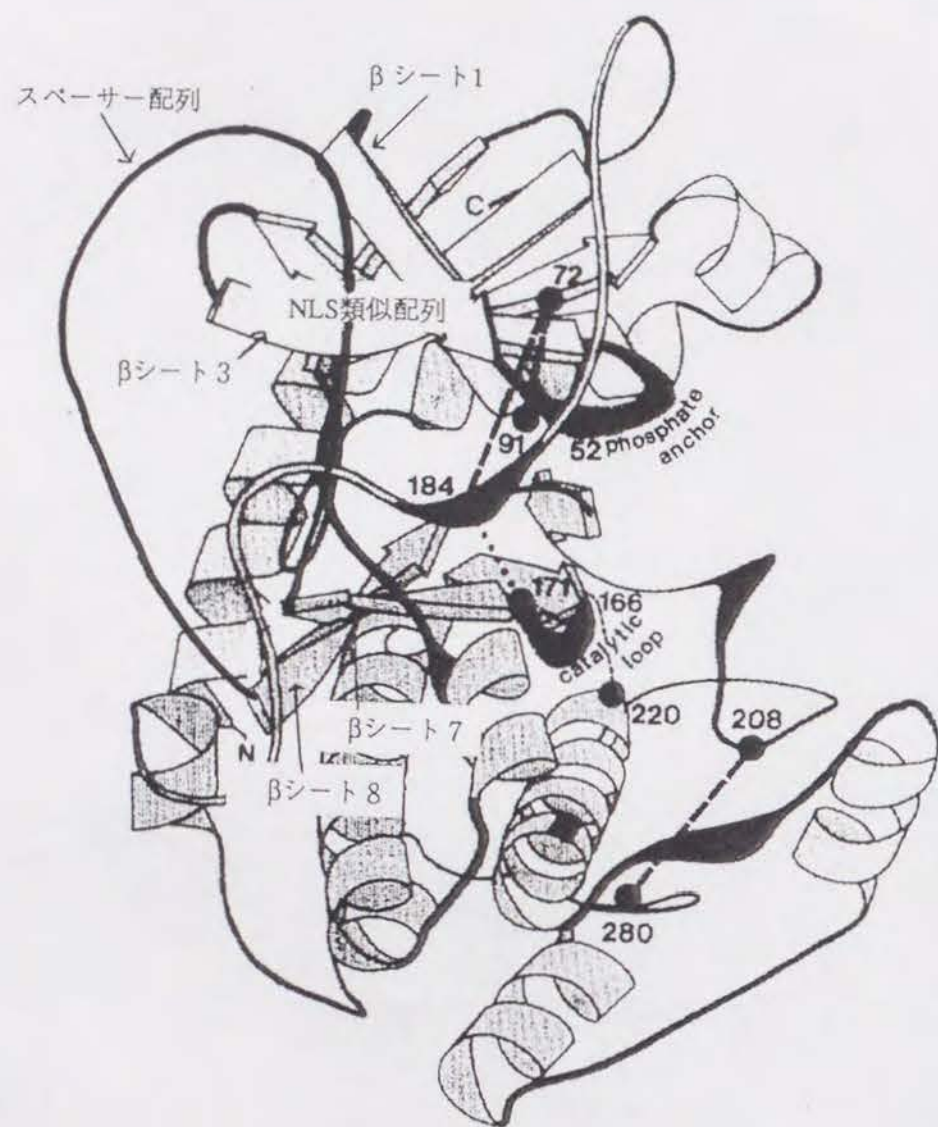


図25: dsk1のNLS類似配列及びスパーサー領域の予想立体配置

cAMP依存性プロテインキナーゼの結晶解析のデータをもとに(Knighton et al., 1991), 活性中心の構造は保存されていることを仮定してdsk1のNLS類似配列及びスパーサー配列を当てはめた。図中の数字はヒトcAMP依存性プロテインキナーゼαの残基番号。52Gly(グリシンループ内), 72Lys(図24中の最後のリジン残基), 91Glu, 166Asp, 171Asn, 184Asp, 208Glu, 220Asp, 280Arg。破線はイオン対、点線は165Argから197Thrにのびる。リボンはαヘリックス、矢印はβシート。dsk1のNLS類似配列は1番目のβシートの先端および3番目のβシートの末端に位置する。スパーサー配列は7、8番目のβシートの間に位置し、分子表面に露出して、上のNLS類似配列を覆うように配置するかも知れない。

## dsk1キナーゼ活性の変動

dsk1キナーゼの活性とG2期あるいは分裂期停止した細胞におけるdsk1の磷酸化状態の関係はdsk1キナーゼの機能を考える上で重要かもしれない。分裂期停止した細胞で主要な磷酸化された移動度の小さいdsk1の活性は増加した。dsk1のin vitro自己磷酸化能の増大に比して、過剰なモル比で存在するMBPへのin vitro磷酸化能の増大が小さかった(図13)。基質を用いたdsk1のin vitro磷酸化能を十分に検出できていないのかもしれない。分裂期停止した細胞ではdsk1キナーゼが活性化されて細胞を分裂期からの移行を促す状態にしているのかもしれない。cs dis1停止(分裂期)した状態では、dsk1は移動度の小さい型が主であるので(図6)、dsk1キナーゼ活性は上昇していると考えられる。しかし、cs dis1変異では、基質の状態等、dsk1キナーゼが作用しにくくなっているのかもしれない。dsk1の活性が正常な細胞周期で制御されているかどうかを調べる必要があるし、dsk1のin vivoの基質の同定は非常に興味深い。

このように、dsk1キナーゼはリン酸化によって活性及び細胞内局在を変えて分裂期の進行をモニターするのもかも知れない。

dsk1キナーゼの発見は分裂期における新しいタンパク質磷酸化システムの存在を示唆する。このシステムは細胞周期が遅延あるいは停止した時に働く。いわば、染色体DNAが損傷したときにG2期から分裂期への進行を遅延させるRAD9チェックポイントシステム(Weinert and Hartwell, 1990)に類似している。dsk1キナーゼの細胞周期での機能を理解するうえで、dsk1キナーゼを制御する因子の同定が重要と思われる。

IIA型プロテインホスファターゼとdsk1キナーゼの反応はcs dis1変異に関して拮抗する

cs dis1変異によって、I型、IIA型プロテインホスファターゼ活性に変動があるかどうかは明かではない。しかし、cs dis2(I型プロテインホスファターゼ)変異も、cs dis3(出芽酵母SIT4プロテインホスファターゼ関連因子SSD1ホモログ)変異も、cs dis1変異に類似した表現型をしめすこと、そして、これら三種のdis変異間の二重変異株が致死になることは、cs dis1変異がプロテインホスファターゼ機能に関連していることを示唆する。IIA型プロテインホスファターゼの主要活性を担うppa2<sup>+</sup>遺伝子(Kinoshita et al., 1990)の欠失によってcs dis1変異が相補される。cs dis1変異は、1.IIA型プロテインホスファターゼの異常が直接の原因であるのか、2.IIA型プロテインホスファターゼと拮抗する反応が抑圧されていると考えられる。

Δdis1Δdsk1とΔdis1の生育に顕著な差がないこと、Δdis1Δdsk1二重変異によるcs dis表現型をΔppa2が相補できないことから、1.の仮説は適さない。

2.の仮説にしたがえば、IIA型プロテインホスファターゼに拮抗する反応はdsk1キナーゼが関与する。以下にcs dis1変異について推論した。dis1蛋白質は微小管に結合することがしめされた(Kurooka 1992; Nabeshima 1993)。Δdis1変異株は33°Cでは正常に生育するが、20°C(低温)では生育できない。機能を重複するホモログが存在する例として、分



分裂酵母DNAトポイソメラーゼ、topI<sup>+</sup>/topII<sup>+</sup>(Uemura et al., 1984)あるいは、cdc2プロテインキナーゼの活性を負に制御するwee1<sup>+</sup>/mik1<sup>+</sup>プロテインキナーゼ(Lundgren et al., 1991)で見られるように、ホモログの一方の欠失は生育に影響がないか、温度に依存せず何らかの表現型を示す。従って、dis1<sup>+</sup>遺伝子の欠失( $\Delta$ dis1)が低温でのみ致死になることは、機能を重複するホモログが存在する可能性を示唆するとは思えない。むしろ、dis1蛋白質欠損下ではdis1と会合するような生育に必須な、微小管結合性の蛋白質X(?)の機能が低温下では遂行できず、その結果が分裂期欠陥(dis)表現型をしめすのではないか。いわば、dis1蛋白質は必須蛋白質Xの制御因子かもしれない。dis1蛋白質は蛋白質Xの微小管結合性を直接的に、あるいは、蛋白質Xの修飾反応(磷酸化反応)を調整して間接的に支持するかもしれない。この磷酸化はIIA型プロテインホスファターゼによって負に制御され、dsk1/dsk1ホモログ(?)によって正に制御されるのかもしれない(図26)。最近、cs dis1変異のマルチコピーサプレッサー遺伝子であり、生育に必須なsds11<sup>+</sup>遺伝子(Takeuchi 1990)が温度感受性ts cut3変異の変異遺伝子であることがわかった(Saka 1993)。蛋白質Xはこのsds11<sup>+</sup>遺伝子と関連するかもしれない。

cs dis1変異ではcdc2キナーゼのヒストンH1キナーゼ活性は高いまま(Kinoshita et al., 1991)、スピンドル形成、伸長及び崩壊はおこるが、姉妹染色分体の分離がおこらず、スピンドルによって不均等に配置される(Ohkura et al., 1988)。これは、スピンドル伸長にはcdc2キナーゼの不活性化は必要ないことを示唆する。姉妹染色分体の分離がcdc2キナーゼの不活性化の引き金になるのかもしれない。

cs dis1変異はキネトコア微小管と染色体の結合(McIntosh and Hering, 1991)に欠陥があるのかもしれない。正常な染色体は両方向のキネトコア微小管に反応できるが、cs dis1変異では一方向のキネトコア微小管としか反応できないために、姉妹染色分体が分離できず、しかし、スピンドルの伸長によって片方の極に配置されるのかもしれない。dis1蛋白質、IIA型プロテインホスファターゼ、dsk1キナーゼによる磷酸化/脱磷酸化で制御される未知の蛋白質Xがキネトコア微小管と染色体の結合に関与するのかもしれない。

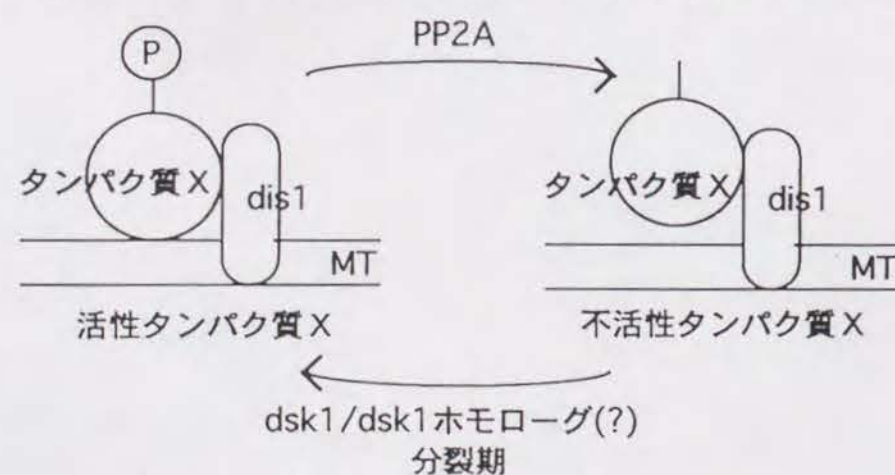


図26: 仮説

分裂期に必須な未知タンパク質Xの磷酸化による活性制御にdis1タンパク質は関わる。磷酸化はPP2A(IIA型プロテインホスファターゼ)によって負に制御されて、dsk1/dsk1ホモログ(?)によって正に制御される。Pは磷酸基、MTは微小管。

## 材料と方法

### 株と培地

分裂酵母の一倍体が使われた(Gutz et al., 1974)。cs dis1-288株は過去に示された(Ohkura et al., 1988)。 $\Delta$ dis1C、 $\Delta$ dis1変異株はKurooka, 1992に示された。さらに、以下の細胞周期変異株が使われた; nda3-KM311(Hiraoka et al., 1984)、nuc2-663(Hirano et al., 1988)、cdc25-22(Russell and Nurse, 1986)、cdc2-33(Nurse et al., 1976)、cdc10-129(Nurse et al., 1976)、cdc17-K42(Nasmyth and Nurse, 1981)、wee1-6、cdc2-1w、cdc2-3w(Nurse and Thuriaux, 1980)。完全培地YPDおよび最小培地EMM2が使用された。

### 酵母細胞の形質転換、dsk1<sup>+</sup>遺伝子のクローニング

分裂酵母の形質転換に酢酸リチウム法が使われた(Ito et al., 1983)。ただし、0.1M酢酸リチウムのpHは4.9。分裂酵母cs dis1-288変異株を出芽酵母LEU2遺伝子を選択マーカーとして持ったpDB248<sup>+</sup>ベクター(Beach and Nurse, 1981)でつくった分裂酵母のゲノムライブラリーで形質転換した。cs+leu+の形質転換株から回収したプラスミドをサブクローニングして最小相補DNA断片を決定した。制限酵素マッピングからcs dis1変異を相補する八個の独立したDNA断片があることがわかった(Takeuchi, 1989)。これらのプラスミドの一つ、pDS113がdsk1<sup>+</sup>遺伝子を含んでいる。pDS113-6(p(dsk1))はpDS113のPvuII/BglII 2.5 Kb断片をベクターpSK248のSmaI/BamHIに挿入してつくった。pDS113-8はpDS113-6をMluI/HindIIIで切断後、平滑末端化して得られた。pDS113-9(p(dsk1-sp))はまずpTD184をEcoT22I/HpaIで切断して平滑末端化してpTD184EHを作成した。pTH248(HindIIIで2mmARS及びleu2遺伝子が切り出せる)をHindIII切断して得られる6kb 2mmARS/leu2をpTD184EHのHindIII部位に挿入して作成した。プラスミドpADH(dsk1)(pAS(184TC))の作成は、まずpTD184をTth111Iで切断して、ClaIリンカー(タカラ、10mer)を挿入して、pTD184TCを作成した。pTD184TCをClaIで切断して得られる断片を平滑末端化して、分裂酵母ADHプロモーター(Russell and Hall, 1983)の制限酵素SmaI部位に挿入した。従って、pADH(dsk1)はアミノ末端が23アミノ酸欠失したdsk1を発現する。pADH(dsk1-sp)(pAS(18-4))は、まずpTD184TCをEcoT22I/HpaIで切断して平滑末端化してpTD184EHTCを作成した。このpTD184EHTCをClaIで切断して得られる断片を平滑末端化して同上ADHプロモーターに組み込んだ。pADH(spacer)(pAS(NMS67))はpNMS67をNdeI/SmaIで切断して得られる断片を平滑末端化してベクターpAS248のSmaI部位に挿入して作成した。pAS(18-1)はpTD184をHhaIで切断して得られる1.7 Kb断片をpAS248のSmaI部位に挿入して作成した。

サザンブロット、ノーザンブロット、塩基配列決定



通常のサザーン、ノーザンハイブリダイゼーションを行った(Maniatis et al.,1982)。塩基配列決定はジデオキシ法で行った(Yanisch-Perron et al.,1985)。

#### dsk1<sup>+</sup>遺伝子破壊

二つの異なる方法(挿入および欠失)をとった。挿入変異に関しては、まず、分裂酵母 *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子(1.8 Kb *SacI*)を *dsk1<sup>+</sup>* 遺伝子を含む6.5Kb *HindIII*断片中(*pDS113*)の相補能に必須な *SacI*部位に挿入した(*pTD185*)。この *pTD185*を *BglII/PvuII*で二重切断して線状化した4.3 Kb断片で二倍体(*TP6D*; *h<sup>+</sup>h<sup>-</sup>leu1/leu1 his2/+ ade6-210/ade6-216 ura4/ura4*)を形質転換した。安定な *ura<sup>+</sup>*形質転換株の四分子解析した。この二倍体のDNAを *BglII/ClaI*二重切断してサザーンハイブリダイゼーションをおこない、相同組換えによる挿入で予想される大きさのDNA断片を検出した。また、欠失変異に関しては、*dsk1<sup>+</sup>*遺伝子を含む2.5 Kb *BglII/PvuII*断片を *Bluescript KS(+)*の *BamHI/EcoRV*部位に挿入して、プラスミド *pTD184*を作成した。次に、*pTD184*を *MluI/NdeI*二重切断して、*dsk1<sup>+</sup>*遺伝子の内部の0.7 Kb断片を欠失させて平滑末端化して *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子の1.8 Kb *SmaI*断片を挿入した。こうしてできたプラスミド *pTD184MNV*から得た3.5 Kb *ClaI/NotI*断片で上述した二倍体を形質転換した。二倍体および一倍体のゲノムDNAに対するサザーンハイブリダイゼーションで破壊された遺伝子由来の予想される大きさのDNA断片を検出した。*dsk1<sup>+</sup>*遺伝子の挿入破壊株および欠失破壊株は、*ade6*マーカーを遺伝子交配で除去して、その表現型が調べられた。本文中で  $\Delta dsk1$ 変異株とあるのは欠失破壊株(*h<sup>-</sup>leu1 ura4 dsk1::ura4<sup>+</sup>*)である。

#### *nmt1*プロモーターによる *dsk1<sup>+</sup>*遺伝子の誘導発現

*nmt1<sup>+</sup>*遺伝子のプロモーター(Maundrell,1990)で *dsk1<sup>+</sup>*遺伝子を発現させるために、プラスミド *pREP1*(a kind gift of Dr.Maundrell)を *BamHI*で切断して、*dsk1<sup>+</sup>*遺伝子のコード領域を含んだ *pTD184TBVB*の1.6 Kb *BamHI*断片を挿入して、プラスミド *pNM(184TBVB)*を作成した。このプラスミドを野生株(*HM123*; *h<sup>-</sup>leu1*)あるいは *cs dis1-288*変異株に2 $\mu$ M チアミン存在下で最小培地 *EMM2*上で形質転換した。形質転換株はまず2 $\mu$ M チアミンを含んだ *EMM2*で生育させて、対数増殖期の細胞を遠心集菌(3000rpm,5分)して、3回洗い、チアミン無しの *EMM2*に移した。*nmt1*プロモーターからの誘導発現がはじまるまで、33°C,10時間を要する。対数増殖期に維持するために、適当な間隔で新しい *EMM2*で交換する。

#### FACSscan 分析

細胞のDNA含量をモニターするためにベクトンデキンソンFACSscanを用いた。方法はCostello et al., 1986に類似した。 $2 \times 10^7$ 細胞を集菌後、0.5mlの水で洗浄。0.2mlの水に懸濁して、150ml 40%エタノールを加えてボルテックス、200 $\mu$ l 60%エタノールを加えてボルテックス、更に、もう一回200 $\mu$ l 60%エタノールを加えてボルテックス。最後に750 $\mu$ l 100%エタノールを加えてよくボルテックスして混ぜる。これを4°Cで一昼夜保温。次に、

0.5ml 氷冷50mM クエン酸ナトリウム(pH7)で洗浄する。0.5mlの同じバッファーに懸濁して、10mg/ml RNase A(Sigma,boiled in TE)の50 $\mu$ lを加えて37°C 2時間以上保温した。こうして調製したサンプルの50 $\mu$ lをシース液で10倍希釈してpropidium iodide(Sigma,ストックは2.5mg/ml in Na-citrate buffer)を最終濃度10 $\mu$ g/ml加える。

#### 間接免疫蛍光法

分裂酵母の間接免疫蛍光法は基本的にHagan and Hyams,1988;Hirano et al.,1988に従った。細胞のメタノール固定は基本的にはBooher et al.,1989に従った。まず細胞をWhatman GF/C(glass microfibre filter,2.4 cm)で集菌して、予め冷やした2ml メタノール(スピッツ管)にそのフィルターを浸して少なくとも8分以上-80°Cで冷却する。その後、3mlの水を加えてピペッティングで細胞をフィルターから剥がす。フィルターを除いた後、更に5mlの水を加えてボルテックスで懸濁する(計10ml)。遠心(3000rpm,5分)して集菌、次にPEMS(0.1M PIPES,1mM EGTA,0.1mM MgSO<sub>4</sub>,1.2M sorbitol pH6.9)で洗浄する。0.1-0.5 mg/ml ザイモリエース含PEMSに懸濁して37°C 10分保温する。次に、1%Triton X-100含PEMSに30秒位懸濁する。PEMで3回洗浄後、PEMBAL(1%BSA,0.1%アジ化ナトリウム,0.1M リジン含PEM)に懸濁して4°Cに保温する。以降はグルタルアルデヒド/パラホルムアルデヒド固定の操作と同じ。抗トリパノソーマ $\alpha$ チューブリンモノクローナル抗体TAT-1(a kind of Dr.K. Gull)は分裂酵母の微小官染色に使われた(Woods et al.,1989;Hagan and Yanagida,1990)。ただし、ザイモリエースの濃度は1.2mg/mlであった。抗*dsk1*抗体はアフニティ精製後、セントリスタットで濃縮したものをPEMBALで10倍希釈したものを使った。二次抗体として抗ウサギFITC抗体(Cappel)をPEMBALで200倍希釈した。二次抗体は予め分裂酵母の細胞抽出液で吸着させた。

#### イムノプロット、免疫沈殿

イムノプロットの方法は基本的にTowbin et al.(1979)に従った。但し、二次抗体は5%スキムミルク含PBSで200倍希釈したHRP結合プロテインAを用い、検出はECL化学蛍光法(Amersham)を用いた。抗燐酸化チロシン抗体(PY20,ICN immunobiologicals)によるイムノプロットは基本的にMorrison et al.,(1988)の方法に従った。まず、プロットを2%BSA含TBS(10mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH8)でブロックする。その後、プロットをTBST(0.05% Tween-20含TBS)で5分ずつ2回洗浄する。TBSTで1000倍希釈した抗燐酸化チロシン抗体と室温で1時間あるいは4°Cで一晩保温する。その後、TBSTで10分ずつ3回洗浄する。二次抗体はTBSTで300倍に希釈したHRP結合抗マウスIgG抗体を用い、室温で1時間保温した。その後、TBSTで10分ずつ3回洗浄した。抗*cdc2*抗体(基生研,長浜先生)は5%スキムミルク含PBSで10倍希釈した。抗*dsk1*抗体のアフニティ精製は基本的にはOhkura et al.,1989に従った。但し、抗体抽出は20mM Glycine-HCl(pH2.3),0.5M NaCl,100 $\mu$ g/ml BSAで行った。抗*cdc13*抗体(a kind gift of Dr.I.Hagan)もアフニティ精製したものを使った。酵母細胞抽出は基本的にShiozaki and Yanagida,1992に従った。但し、用いた抽出バッ



アーはMHB(25mM Tris-HCl pH7.5, 15mM EGTA, 150mM NaCl, 60mM B-glycerophosphate, 15mM P-nitrophenylphosphate, 0.1mM NaF, 1mM DTT, 0.1% NP-40, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF, 10mg/ml soybean trypsin inhibitor, 10mg/ml TPCK, 1mg/ml aprotinin)。また、細胞は遠心で集菌後、必ずstop buffer(0.15M NaCl, 50mM NaF, 10mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub> pH8)で洗浄した。免疫沈殿は6mg可溶性蛋白質から行った。免疫沈殿は基本的にShiozaki and Yanagida, 1992; Harlow et al., 1988に従った。

#### PAP処理

計6mgの可溶性蛋白質から200mlのアフィニティ精製した抗dsk1抗体で免疫沈殿を行い、Cooper et al., 1986に従いpotato acid phosphatase(PAP, Boehringer, grade II)で処理した。抗dsk1免疫複合体をMHBで5回洗浄後、ホスファターゼバッファー(40mM PIPES, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1mM aprotinin pH6.0)で5回洗浄する。計50ml(PAP 1.1mg)で30°C, 30分保温する。その後、MHBで3回洗浄した。PAPはMonoQカラムで精製した。

#### 蛋白質のin vivo 標識

本文中の細胞を10mlの最小培地EMM1(1/30 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, フタル酸カリウムを除いたEMM2)で培養して、3×10<sup>6</sup> cells/ml以下の細胞濃度の時に1mCi(あるいは磷酸化アミノ酸分析には10 mCiを使用)無機磷酸(0.1M HCl)と同量の0.1M Tris(pH11)を加えて更に3-4時間培養する。細胞質抽出液の調製、免疫沈殿は基本的に上述に同じ。但し、pDS113-9(p(dsk1-sp))を持った株の細胞抽出液はまず、RIPA buffer(1% NP-40, 1% Nadeoxycholate, 0.1% SDS含MHB)中で調製後、最終濃度1% SDSを添加して5分煮沸する。その後、15000rpm, 20分の遠心で上清を回収して、それを10倍量のRIPA bufferで希釈(SDS濃度を0.1%に下げため)、免疫沈殿を行った。免疫複合体はRIPA bufferで少なくとも6回洗浄した。尚、100mg/ml RNaseを使用した。

#### 抗体の調製、大腸菌dsk1(bdsk1)の調製

アミノ末端23残基を欠失したdsk1ポリペプチドとスパーサー領域からなるdsk1ポリペプチドをT7システム(Studier et al., 1986)で大腸菌でつくった。まず、プラスミドpUC118のHindIII部位に10mer BamHIリンカー(Takara shuzo)を挿入してpUC118Bを作成した。このプラスミドのXbaI部位に、dsk1\*遺伝子のスパーサー領域を含む0.4 Kb EcoT22I/MluI断片を挿入して、プラスミドpS67Pを作成した。このプラスミドの0.4 Kb BamHI断片をプラスミドpAR3039のBamHI部位に挿入してプラスミドpARDS18-1を作成した。このプラスミドpARDS18-1は大腸菌BL21(DE3)pLysS(Rosenberg et al., 1987)株中で大量のポリペプチド(SDS-PAGE上の分子量は22 Kd, 予想分子量は16 Kd この違いはスパーサー領域のアミノ酸組成がセリン、スレオニン、プロリンに富んでいることによるのかもしれない)を作成した。次に、プラスミドpTD184をTthIII1で切断して10 mer BamHIリンカーを挿

入した。このプラスミドをEcoRVで切断して更にBamHIリンカーを挿入して、プラスミドpTD184TBVBを作成した。このプラスミドの1.6 Kb BamHI断片はdsk1+遺伝子のアミノ末端23残基を欠失しているかわりに、B-galactosidaseのカルボキシル末端12残基を付加している。この断片をプラスミドpAR3039のBamHI部位に挿入してプラスミドpARDS18-3を作成した。このプラスミドpARDS18-3は大腸菌BL21(DE3)中で大量のポリペプチド(分子量60 Kd)を産生した。これら二種のポリペプチドをWatt et al., 1985の方法に従って精製してウサギを免疫した(Hirano et al., 1988)。37°Cで培養した大腸菌からinclusion body分画を10000rpm 10分の遠心で集め、buffer A(50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM PMSF)で洗浄後、2.5% SDS, 10% glycerol含buffer A中でソニケーションで可溶化して、最後にbuffer AでAmpure DT カラム(Amersham)に通した。

可溶性bdsk1は大腸菌の生育条件をかえることでも調製できた。37°Cのprecultureを10倍希釈して20°C 25°CでOD<sub>600</sub>が1.0まで生育させて、IPTGを最終濃度0.1 mM添加して更に20時間培養する。こうして、大腸菌の生育を遅延させるとbdsk1は可溶性分画に多量に回収できる。このbdsk1をphosphocellulose columnで分画した。

#### 蛋白質キナーゼのin vitro アッセイ、磷酸化アミノ酸分析

計6mgの可溶性タンパク質からアフィニティ精製した抗dsk1抗体でdsk1免疫複合体を調製した。免疫複合体はMHBで3回洗浄後、KAB(50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.4mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)で3回洗浄した。その後、免疫複合体は10ml KABで100 mM ATP, 10mCi r-32P-ATP, 0.5mg/ml MBP(bovine brain, Sigma)あるいは0.5mg/ml histone H1(calf tymus, Boehringer)存在下で25°C, 15分保温した。但し、全ての反応は25°Cで5分予め保温した。反応はSDS sample bufferの添加、5分の煮沸で行った。<sup>32</sup>Pラベルされたdsk1をSDS-PAGE ゲルから回収して6N HCl, 110°C, 1.5時間で酸加水分解後、二次元薄層クロマトグラフィー(一次元目、pH1.9; 二次元目、pH3.5)で展開して分析した(Cooper et al., 1983)。



## 参考文献

- Alessandrini, A., Crews, C. M. and Erickson, R. L. (1992). Phorbol ester stimulates a protein tyrosine/threonine/kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 8200-8204
- Beach, D. and Nurse, P. (1981). High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 290: 140-142.
- Ben-David, Y., Letwin, K., Tannock, L., Berstein, A. and Pawson, T. (1991). A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J.* 10: 317-325.
- Booher, R. N. and Beach, D. H. (1988). Involvement of *cdc13+* in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J.* 7: 2321-2327
- Booher R. and Beach, D. (1989). Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bws1+* in fission yeast mitotic control. *Cell* 57: 1009-1016
- Booher, R. N., Alfa, C. E., Hyams, J. S. and Beach, D. H. (1989). The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58: 485-497.
- Cairns, B. R., Ramer, S. W. and Kornberg, R. D. (1992). Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Gene. Dev.* 6: 1305-1318
- Chen, J., Martin, B. L. and Brautigan, D. L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 257: 1261-1264
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J. S. and Pelech, S. L. (1991). definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mapk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266: 15280-15184
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatase. *Ann. Rev. Biol.* 58: 453-508

Cooper, J. A. and King, C. S. A. (1986). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol. Cell Biol.* 6: 4467-4477.

Cooper, J. A., Sefton, B. M. and Hunter, T. (1983). Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Meth. Enzym.* 99: 387-402

Courchesne, W. E., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1989). A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S.cerevisiae*. *Cell* 58: 1107-1119

Crews, C. M. and Erickson, R. L. (1992). Purification of a murine protein tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 8205-8209

Dailey, D., Schieven, G. L., Lim, M. Y., Marquardt, H., Gilmore, t., Thorner, J. and Martin, G. S. (1990). Novel yeast protein kinase (YPK1 gene product) is a 40-kilodalton phosphotyrosyl protein associated with protein-tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6244-6256

Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1986). Protein import into the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2: 367-390

Erickson, A. K., Payne, D.M., Martino, P. A., Rossomando, A. J., Shabanowitz, J., Weber, M. J., Hunt, D. F. and Sturgill, T. W. (1990). Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 19728-19735

Fan, J.-B., Chikashige, Y., Smith, C. L., Niwa, O., Yanagida, M. and Cantor, C. R. (1988). Construction of a NotI restriction map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 17: 2801-2818.

Featherstone, C. and Russell, P. (1991). Fission yeast p107<sup>woel</sup> mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 349: 808-811

Garrett, S. and Broach, J. R. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruption of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes and Develop.* 3: 1336-1348.

Garrett, S., Menold, M. M. and Broach, J. R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 11: 4045-4052.



Gartner, A., Nasmyth, K. and Ammerer, G. (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes. Dev.* 6: 1280-1292

Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. and Kirschner, M. W. (1991). *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* 67: 197-211

Georgi, L. L., Albert, P. S. and Riddle, D. L. (1990). *daf-1*, a *C.elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell* 61: 635-645

Gordon, J. I., Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P. and Gokel, G. W. (1991). Protein N-myrysoylation. *J. Biol. Chem.* 266: 8647-8650

Gould, K. L. and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2*<sup>+</sup> protein kinase regulated entry into mitosis. *Nature* 342: 39-45

Grimm, C., Kohli, J., Murray, J. and Maundrell, K. (1988). Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol.Gen.Genet.* 215: 81-86.

Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Lopreno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of genetics 1. New York, Plenum Press. 395-446.

Hagan, I., Hayles, J. and Nurse, P. (1988). Cloning and sequencing of the cyclin-related *cdc13*<sup>+</sup> gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J. Cell Sci.* 91: 587-595

Hagan, I. and Hyams, J. S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J.Cell Sci.* 89: 343-357.

Hagan, I. and Yanagida, M. (1990). Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7*<sup>+</sup> gene. *Nature* 347: 563-566.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Haystead, T. A., Dent, P., Wu, J., Haystead, M. M. and Sturgill, T. W. (1992). Ordered phosphorylation of p42<sup>mapk</sup> by MAP kinase kinase. *FEBS* 306: 17-72

Hindley, J. and Phear, G. A. (1984). Sequence of the *cdc2* gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 31: 129-134

Hirano, T., Hiraoka, Y. and Yanagida, M. (1988). A temperature sensitive mutation of the *S.pombe* gene *nuc2*<sup>+</sup> that encodes a nuclear scaffold-like protein blocks spindle elongation in mitotic anaphase. *J.Cell Biol.* 106: 1171-1183.

Hiraoka, Y., Toda, T. and Yanagida, M. (1984). The *NDA3* gene of fission yeast encodes  $\beta$ -tubulin: a cold sensitive *NDA3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* 39: 349-358.

Howell, B. W., Afar, D. E. H., Lew, J., Douville, E. M. J., Icely, P. L. E., Gray, D. A. and Bell, J. C. (1991). STY, a tyrosine-phosphorylating enzyme with sequence homology to serine/threonine kinases. *Mol.Cell Biol.* 11: 568-572.

Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K. and Okayama, H. (1991). *Wee1*<sup>+</sup>-like gene in human cells. *Nature*. 353: 80-83

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* 153: 163-168.

Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type1 and type2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 63: 405-415

Kinoshita, N., Goebel, M. and Yanagida, M. (1991). The fission yeast *dis3*<sup>+</sup> gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Mol.Cell Biol.* 11: 5839-5847.

Kinoshita, N., Yamano, H., Le Bouffant-Sladeczek, F., Kurooka, H., Ohkura, H., Stone, E. M., Takeuchi, M., Toda, T., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1991). Sister-chromatid separation and protein dephosphorylation in mitosis. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LVI Cold Spring Harbor New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 621-628

Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T., Ashford, V. A., Xuong, N.-H., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 407-414



Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T., Ashford, V. A., Xuong, N.-H., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 414-420

Kosaka, H., Gotoh, Y., Matsuda, S., Ishikawa, M. and Nishida, E. (1992). Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* 11: 2903-2908

Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64:903-914

Kurroka, H. (1992). Master's thesis

Lee, M. G. and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* 327: 31-35

Lindberg, R. A., Quinn, A. M. and Hunter, T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *TIBS* 17: 114-119.

Lorincz, A. T. and Reed, S. I. (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* 307: 183-185

Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64: 1111-1122.

Maldonado, F. and Hanks, S. K. (1988). A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Ca. *Nucleic Acids Res.* 16: 8189-8190

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Maundrell, K. (1990). nmt1 of fission yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 10857-10864.

McIntosh, J. R. and Hering, G. E. (1991). Spindle fiber action and chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 403-426

Millar, J. B. A., Lenaers, G. and Russell, P. (1992). Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J.* 11: 4933-4941

Millar, J. B. A., Russell, P., Dixon, J. E. and Guan, K. L. (1992). Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPase in fission yeast. *EMBO J.* 11: 4943-4952

Moreno, S., Hayles, J. and Nurse, P. (1989). Regulation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase during mitosis. *Cell* 58: 361-372.

Morrison, D. K., Browning, P. J., White, M. F. and Roberts, T. M. (1988). Tyrosine phosphorylations in vivo associated with v-fms transformation. *Mol. Cell Biol.* 8: 176-185.

Nadin-Davis, S. A. and Nasim, A. (1988). A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the ras gene in fission yeast. *EMBO J.* 7: 985-992

Nasmyth, K. and Nurse, P. (1981). Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 182: 119-124.

Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 146: 167-178.

Nurse, P. and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96: 101-106

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-508

Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. and Yanagida, M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* 7: 1465-1473.

Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M. (1989). The fission yeast *dis2<sup>+</sup>* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 57: 997-1007.

Ottillie, S., Chernoff, J., Hannig, G., Hoffman, C. S. and Erickson, R. L. (1992). The fission yeast *pyp1<sup>+</sup>* and *pyp2<sup>+</sup>* encode protein tyrosine phosphatases that negatively regulate mitosis. *Mol. Cell Biol.* 12: 5571-5580

Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., Lee, M. S., Ogg, S., Falk, J. L., Swenson, K. I. and Piwnicka-Worms, H. (1991). Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34<sup>cdc2</sup> in a *wee1<sup>+</sup>*



dependent manner. EMBO J. 10: 1255-1263.

Patterson, M., Schafain, R. A., Fangman, W. L. and Rosamond, J. (1986). Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598

Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J.-H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). EMBO J. 10:885-892

Pelech, S. L. and Sanghera, J. S. (1992). Mitogen-activated protein kinase: versatile transducers for cell signaling. TIBS 17: 233-238  
Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. and Nigg, E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of Lamins by cdc2 kinase. Cell 61: 591-602

Posada, J. and Cooper, J. A. (1992). Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocyte. Science 255: 212-215

Robbins, J. Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64: 615-623

Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D., Lin, S. and Dunn, J. J. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56: 125-135.

Rossomando, A., Wu, J., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1992). The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase, p42<sup>mapk</sup> is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 14373-14381

Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. Meth. Enzym. 101: 202-211.

Russell, P. and Nurse, P. (1986). cdc25<sup>+</sup> functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. Cell 45: 145-153.

Russell, P. and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by wee1<sup>+</sup>, a gene encoding a protein kinase homolog. Cell 49: 559-567.

Russell, P. and Hall, B. D. (1983). The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 258: 143-149.

Seeger, R., Ahn, N. G., Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ericsson, L., Bratlien, R. L., Cobb, M. H. and Krebs, E. G. (1991). Microtubule-associated protein 2 kinase, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implication for their mechanism of activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 6142-6146

Solomon, M. J., Lee, T. and Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34<sup>cdc2</sup> activation: identification of an activating kinase. Mol. Biol. Cell 3: 13-27

Shiozaki, K. and Yanagida, M. (1992). Functional dissection of the phosphorylated termini of fission yeast DNA topoisomerase II. J. Cell Biol. 119: in press

Stevenson, B. J., Rhodes, N., Errede, B. Sprague, G. F. (1992). Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. Genes. Dev. 6: 1293-1304

Studier, F. W. and Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189: 113-130.

Sutton, A., Immanuel, D. and Arndt, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. Mol. Cell. Biol. 11: 2133-2148

Tan, J. L. and Spudich, J. A. (1990). Developmentally regulated protein-tyrosine kinase genes in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Cell. Biol. 10: 3578-3583

Takeuchi, M. (1990). Master's thesis

Teague, M. A., Chaleff, D. T. and Errede, B. (1986). Nucleotide sequence of the yeast regulatory gene STE7 predicts a protein homologous to protein kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 7371-7375

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

Uemura, T. and Yanagida, M. (1984). Isolation of type I and type II DNA topoisomerase mutants



from fission yeast; single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J.* 3: 1737-1744

Ward, G. and Kirschner, M. W. (1990). Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamina. *Cell* 61: 561-577

Watt, R. A., Shatzman, A. R. and Rosenberg, M. (1985). Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 5: 448-456.

Weinert, T. A. and Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 241: 317-322.

Wilson, R., Brenner, A. A., White, T. B., Engler, M. J., Gaughran, J. P. and Tatchell, K. (1991). The SRK1 gene of *S. cerevisiae*, a suppressor of *bcy1* and *ins1*, may be involved in protein phosphatase function. *Mol. Cell Biol.* 11: 3369-3373

Woods, A., Sherwin, T., Sasse, R., McRae, T. H., Baines, A. J. and Gull, K. (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma Brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 93: 491-500.

Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13m18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

## 謝辞

この五年間、薬師如来と阿弥陀如来の絡み合いのごときスタイルで研究を進めてきた私を、常に厳しくそして暖かく御指導御鞭撻して頂いた柳田充弘教授には深く感謝致します。また、常に”世界”と接することのできる環境で学究生活を送れたことは大変な幸でした。他のスタッフの方々にも様々なアドバイスを頂きました。有難うございました。

快適で刺激的な、構造研独特の研究環境の中で、自分自身の持つ物事に対する価値観を再認識させてもらったことは、非常に貴重な経験でした。この素晴らしい環境をつくってくれた皆様に深く感謝致します。有難うございました。